Über den Einfluß von Sauerstoff auf den Verlauf der Hill-Reaktion mit 2,6-Dichlorphenol-Indophenol

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

—

vorgelegt von

Uta Nickel, geb. Brüstlein

—

aus Berlin

1969

—

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543901_0040

Über den Einfluß von Sauerstoff auf den Verlauf der Hill-Reaktion mit 2,6-Dichlorphenol-Indophenol

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Uta Nickel, geb. Brüstlein

aus Berlin

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Oktober 1969

Dekan: Professor Dr. A. Seilacher
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Metzner
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Mauser

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Dem Direktor des Instituts für Chemische Pflanzenphysiologie,

meinem verehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. H. Metzner,

danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und für seine vielseitige Förderung bei der Durchführung der Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG 1

II. METHODIK 7

A. Versuchsmaterial 7

B. Verwendete Chemikalien 7

C. Chloroplastenisolierung 7

D. Chlorophyllbestimmung 9

E. Versuchsanordnung 10

1. Umpumpsystem 10

1.1. Reaktionsgefäß mit Zubehör 10

1.2. Durchflußküvetten 14

1.3. Schlauchquetschpumpe 15

1.4. Kühler 15

1.5. Volumenkorrektur 15

2. Gasmischanlage 16

3. Lichtquelle 16

4. Empfindlichkeit der Anzeige 18

F. Versuchsanordnung für die elektrochemische Reduktion von DCPIP 18

G. Berechnung der Löslichkeit von Sauerstoff im verwendeten Puffergemisch 19

III. EXPERIMENTELLER TEIL 22

A. Vorversuche 22

1. Eigenschaften des Farbstoffs DCPIP 22

2. Proportionalität zwischen DCPIP-Konzentration und Extinktion in der verwendeten Meßanordnung 27

B. Hauptversuche 29

1. Messung der Hill-Aktivität unter Berücksichtigung der Rückoxidation von DCPIPH_2 29

1.1. Versuchsdurchführung und Auswertung 29

1.2. Abhängigkeit der Hill-Aktivität der Chloroplasten von der Zeit nach dem Einfüllen 32

1.3. Versuche zur Eichung des Meßverfahrens 34

a) Abhängigkeit der Hill-Aktivität von der Chloroplastenkonzentration 34

b) Abhängigkeit der Hill-Aktivität von der Beleuchtungsintensität 36

c) Abhängigkeit der Hill-Aktivität von der Sauerstoffkonzentration 38

d) Abhängigkeit der Hill-Aktivität von der Temperatur 39

C. Kinetik der Reduktion von DCPIP 41

1. Einleitung 41

2. Sauerstoffkorrektur der Reduktionskurven 45

2.1. Die Sauerstoffkonzentration als Funktion der Zeit nach dem Einschalten des Lichts 46

2.2. Abschätzung der während der Reduktion von DCPIP mindestens gebildeten Sauerstoffmenge 57

2.3. Korrektur der Reduktionskurven 63

3. Abhängigkeit der Hill-Reaktion von der DCPIP-Konzentration 66

IV. DISKUSSION 79

A. Einleitung 79

B. Zusammenhang zwischen DCPIP-Reduktion und Photophosphorylierung 80

C. Ort der DCPIP-Reduktion 87

Seite

D. CO_2-Fixierung als Nebenreaktion zur DCPIP-Reduktion 88

E. Verhältnis von intakten zu nicht intakten Chloroplasten 91

F. Deutung der erhöhten Rückoxidationsgeschwindigkeit von $DCPIPH_2$ gleich nach dem Ausschalten des Lichtes 91

G. Ausblick 93

V. ZUSAMMENFASSUNG 94

VI. LITERATURVERZEICHNIS 96

I. EINLEITUNG

Die Hill-Reaktion (Hill 1937, Hill and Scarisbrick 1939) ist definiert als photochemische Reduktion eines künstlichen Wasserstoffakzeptors durch Chloroplasten oder deren Fragmente unter der gleichzeitigen Entwicklung von Sauerstoff, der vermutlich aus dem Wasser stammt. Stark vereinfachend kann man die Reaktion folgendermaßen beschreiben:

$$H_2O + A \xrightarrow[\text{Chloroplasten}]{h\nu} AH_2 + 1/2\ O_2$$

Als Wasserstoffakzeptor A sind schon viele verschiedene Substanzen verwendet worden, z.B. Ferricyanid, p-Benzochinon und verschiedene Substitutionsprodukte, $NADP^+$ und Farbstoffe wie 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP), 2,3',6-Trichlorphenolindophenol (TCPIP), Methylviologen, Indigocarmin, etc..

Die Hill-Reagenzien stellen zusammen mit ihrer reduzierten Form Redoxsysteme dar, deren Redoxpotentiale bei Zimmertemperatur und pH 6,6 zwischen +0,42 V (Ferricyanid) und -0,44 V (Methylviologen) liegen. Mit abnehmendem Redoxpotential zeigt sich eine Grenze: Ab ca. +0,1 V werden Akzeptoren von Chloroplasten nur noch reduziert, wenn in Stickstoffatmosphäre gearbeitet wird, weil sonst die sofort einsetzende Rückoxidation durch Sauerstoff (E_o' = +0,81 V) eine Messung der Reduktion unmöglich macht (Wessels 1954, Kok and Datko 1965).

DCPIP nimmt mit seinem Redoxpotential (E_o = 0,24 V) in dieser Hinsicht eine Mittelstellung ein. Es läßt sich auch in Gegenwart von gelöstem Sauerstoff noch praktisch vollständig reduzieren (Wessels 1954, Kok and Datko 1965). Das bedeutet aber nicht, daß reduziertes Dichlorphenol-Indophenol ($DCPIPH_2$) durch gelösten Sauerstoff nicht rückoxidiert wird, sondern nur, daß bei üblichen Chloroplastenkonzentrationen erst bei

sehr kleinen DCPIP-Konzentrationen ($[DCPIPH_2] / [DCPIP] > 10$) die Rückoxidationsgeschwindigkeit gleich der Reduktionsgeschwindigkeit ist.

Die Reduktion der Hill-Reagenzien ist bei höheren Konzentrationen eine Reaktion nullter Ordnung, d.h. sie ist unabhängig von der Konzentration des Hill-Reagenzes. Die in diesem Konzentrationsbereich mit verschiedenen Hill-Reagenzien gemessenen Hill-Aktivitäten liegen alle in der gleichen Größenordnung. Unter den gebräuchlichen Hill-Reagenzien nehmen jedoch DCPIP und TCPIP in zweierlei Hinsicht eine Sonderstellung ein:

1. Während die Reduktion von z.B. Ferricyanid oder p-Benzochinon (Shen 1963) mit einer ATP-Bildung gekoppelt ist, setzt bei der Reduktion von DCPIP eine ATP-Bildung erst bei Farbstoffkonzentrationen kleiner als 10^{-4} Mol/l ein. Dieses Phänomen führte im wesentlichen zu zwei Deutungen: Entweder ist der Reaktionsweg, auf welchem DCPIP reduziert wird, ein anderer als bei Ferricyanid (Avron, Krogmann and Jagendorf 1958) oder der Reaktionsweg ist der gleiche wie bei Ferricyanid, aber DCPIP wirkt in höherer Konzentration gleichzeitig als Entkoppler der ATP-Bildung. Diese zweite Möglichkeit wurde von Gromet-Elhanan et al. (1963) und Shen et al. (1963) sehr wahrscheinlich gemacht.

2. Von allen gebräuchlichen Hill-Reagenzien wird DCPIP am schnellsten reduziert, vorausgesetzt, daß bei der Reduktion mit der üblichen Ausgangskonzentration von 10^{-4} Mol/l gearbeitet wird, und daß bei der Reduktion von z.B. Ferricyanid kein Entkoppler zugegeben wurde.

Für eine Bestimmung der Hill-Aktivität muß die Konzentration von mindestens einem der an der Umsetzung beteiligten Stoffe als Funktion der Zeit und der Chloroplastenkonzentration gemessen werden.

Ausgehend von der Summenformel für die Hill-Reaktion mit Ferricyanid

$$2\,[Fe(CN)_6]^{3-} + 3\,H_2O \xrightarrow[\text{Chloroplasten}]{h\nu} 2\,[Fe(CN)_6]^{4-} + 2\,H_3O^+ + \tfrac{1}{2}\,O_2$$

seien zunächst die gebräuchlichsten Meßverfahren angeführt:

1. Messung der Sauerstoffentwicklung

   a) manometrisch im Warburgapparat

   b) elektrochemisch (häufig mit einer sog. Clarkelektrode, d.h. mit einer Pt-Elektrode, die mit einer dünnen sauerstoffdurchlässigen Membran, z.B. aus Teflon, umgeben ist):

   Holt and French 1948, Fredricks and Jagendorf 1964, Kok and Datko 1965, Schwartz 1965, Swenson and Vernon 1965, Warburg et al. 1965, Walker and Hill 1967, West and Hill 1967, Wassermann and Fleischer 1968.

2. Titration der freiwerdenden Säure oder elektrochemische Messung der pH-Änderung.
   Holt and French 1946, McCarty 1965, Izawa and Hind 1967.

3. Potentiometrische Messung des sich ändernden Verhältnisses der Konzentration von oxidierter und reduzierter Form des Hill-Reagenzes.
   Spikes et al. 1950 und 1954, Wessels 1954, Lumry, Wayrynen and Spikes 1957, Kok and Datko 1965.

4. Spektralphotometrische Messung der Änderung der Konzentration der oxidierten Form des Hill-Reagenzes (Bei allen Hill-Reagenzien ist die oxidierte Form farbig, die reduzierte farblos. Die Extinktion im sichtbaren Spektralbereich, vorzugsweise im Absorptionsmaximum, ist deshalb der Konzentration der oxidierten Form proportional, solange das Lambert-Beer'sche Gesetz erfüllt ist):
   Macdowall 1949, Milner, French et al. 1951, Holt, Smith

and French 1951, Jagendorf 1956, Krogmann and Jagendorf 1959, Punnett 1959, Good 1960, Shen et al. 1963, Gromet-Elhanan and Avron 1963 und 1964, Biggins and Sauer 1964, Fredricks and Jagendorf 1964, Fujita and Myers 1965, Park et al. 1966, Wolf 1966, Constantopoulos and Kenyon 1968.

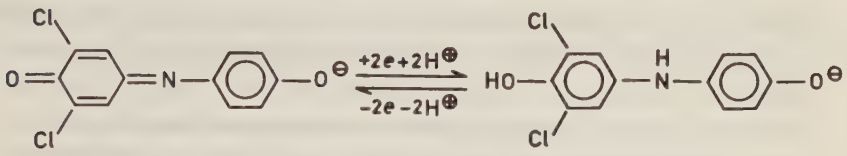
Für die Anwendung der spektralphotometrischen Methode spricht u.a. die große Empfindlichkeit der Methode auch bei kleinen Konzentrationen wegen des hohen Extinktionskoeffizienten der Farbstoffe; außerdem kann man in einem großen Konzentrationsbereich mit der gleichen absoluten Genauigkeit messen. Liegt eine Reaktion nullter Ordnung vor, so erhält man mit der spektralphotometrischen Methode direkt eine Gerade, wenn man die Extinktion in Abhängigkeit von der Zeit registriert, während man bei der potentiometrischen Methode erst noch umrechnen muß; außerdem können potentiometrische Messungen selbst bei Arbeiten unter Stickstoff durch den photochemisch gebildeten Sauerstoff verfälscht werden.

Der Ausgangspunkt für diese Arbeit war die Entwicklung eines kontinuierlich arbeitenden spektralphotometrischen Meßverfahrens zur Bestimmung der Hill-Aktivität mit DCPIP.

Die oxidierte Form des Farbstoffes DCPIP (genauer: das Anion des Farbstoffs) ist tiefblau gefärbt, während die reduzierte Form farblos ist.

Gemessen wird die die Reduktion des Farbstoffs begleitende Extinktionsabnahme im Absorptionsmaximum des Farbstoffs in Abhängigkeit von der Zeit.

Ausgangs- und Endprodukt der Reduktionsreaktion sind:



DCPIP (blau) $DCPIPH_2$ (farblos)

Diese Reaktionsgleichung gibt nicht den tatsächlichen Reaktionsmechanismus wieder. Nach Diebler (1963) werden die Elektronen nacheinander übertragen, wobei in Abhängigkeit vom pH verschiedene Semichinonradikale in sehr kleiner Konzentration als Zwischenprodukte auftreten. Im Rahmen dieser Arbeit können diese Zwischenprodukte aber außer Betracht bleiben.

Schon bei Vorversuchen zur Reduktion von DCPIP und TCPIP - durch Chloroplasten oder elektrolytisch - zeigte sich, daß die Rückoxidation des reduzierten Farbstoffs im Dunkeln keineswegs zu vernachlässigen ist - im Gegensatz zu der Ansicht vieler Autoren, die sich meistens auf die viel zitierte Arbeit von Jagendorf (1956) beziehen. Jagendorf schreibt darin u.a., daß die Rückoxidation des reduzierten Farbstoffs (in diesem Fall TCPIP) bei der Verwendung von "sauberen" Chloroplasten extrem langsam verläuft und also zu vernachlässigen sei.

Diese Ansicht kam vermutlich dadurch zustande, daß gedämpftes Tageslicht, bei dem auch schon eine geringe Farbstoffreduktion abläuft, als "Dunkel" angesehen wurde, so daß durch die Überlagerung von geringer Reduktion und Rückoxidation

keine Rückoxidation beobachtet werden konnte; außerdem wurde die Farbstoffreduktion nicht kontinuierlich verfolgt, sodaß kleine Farbstoffumsätze gar nicht wahrgenommen werden konnten. - Es schien deshalb lohnend, den Einfluß von Sauerstoff auf die Reduktion von DCPIP systematisch zu untersuchen.

Es zeigte sich, daß auch unter weitgehendem Sauerstoffausschluß die Reduktion von DCPIP, ausgehend von einer für Hill-Aktivitätsmessungen üblichen Anfangskonzentration von ca. 10^{-4} Mol DCPIP/l, keine reine Reaktion nullter Ordnung in Bezug auf den Farbstoff ist. Es findet vielmehr in diesem Konzentrationsbereich ein kontinuierlicher Übergang von nullter zu erster Ordnung statt. Für die Charakterisierung der Hill-Aktivität ist es aber wünschenswert, ein von der Konzentration des Farbstoffes unabhängiges Maß zu verwenden.

Es wird in dieser Arbeit versucht, den Übergangsbereich kinetisch zu beschreiben und damit eine Extrapolation auf hohe Farbstoffkonzentrationen, bei denen die Reduktionsreaktion nullter Ordnung ist, zu ermöglichen.

II. METHODIK

A. Versuchsmaterial

Bei den Vorversuchen wurde mit Spinatchloroplasten gearbeitet. Da die Anzucht von Spinat zu langwierig war, wurden später Erbsen - Pisum sativum Feltham First - verwendet, die sich bei CO_2-Fixierungsversuchen schon bewährt hatten (Schürmann 1969). Wurden die Erbsen im Abstand von ca. 2 cm gesetzt, dann waren die ersten Blattfiederpaare nach drei Wochen gleichzeitig voll entfaltet.

B. Verwendete Chemikalien

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, TRIS, Merck, Puffersubstanz
Maleinsäure, reinst, Dr. Schuchhardt, München
NaOH, p.a., Merck
NaCl, p.a., Merck
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$, p.a., Merck
Saccharose, D(+), reinst, Merck
DCPIP, p.a., Merck (Natriumsalz)
TCPIP, reinst, Serva
Aceton, p.a., Merck

Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

C. Chloroplastenisolierung

Bei der Isolierung von Chloroplasten wurde auf Erfahrungen von Institutsmitgliedern zurückgegriffen (Schenk unveröffentlicht, Schürmann 1969) und nach einer kombinierten Methode gearbeitet.

Die bei der Isolierung der Chloroplasten verwendeten Puffergemische wurden aus Stammlösungen von
TRIS / Maleinsäure (0,2 Mol/l),
NaOH (0,2 Mol/l),
NaCl (1 Mol/l),
$MgCl_2$ (0,5 Mol/l)

angesetzt. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffergemische war:

Puffer	NaCl ml	$MgCl_2$ ml	Tris/Maleinsäure ml	NaOH ml	pH
1	15	10	250	150	6,1
2	15	10	250	220	6,7
3	15	10	250	315	7,6

Zusätzlich enthielten die Pufferlösungen 170 g Saccharose pro 1.

Die ersten vollentfalteten Blattfiederpaare wurden von 18 bis 21 Tage alten Erbsen abgeschnitten und in ein auf 0°C gekühltes Becherglas gegeben. Die Blätter (35 - 40 g) wurden in einem Mulltuch zweimal in vorgekühltem bidestilliertem Wasser gewaschen, abtropfen gelassen und trocken geschleudert. Die weitere Isolierung fand in einem Kühlraum bei ca. 0°C statt: 180 ml Puffer (1) wurden in einen Mixer (Fa. Baumüller, Nürnberg) gegeben; der Mixer wurde auf Stufe 1 angeschaltet, die Erbsenblätter dann zugegeben und ca. 7 sec zerkleinert. Anschließend wurde das dunkelgrüne Homogenat durch 12 Lagen Mull von den gröberen Blattresten abfiltriert. Das Filtrat wurde in einer Kühlzentrifuge bei -2°C mit 2000 g 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 160 ml Puffer (2) zum Waschen aufgenommen und wieder 5 Minuten mit 2000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde in Puffer (3) aufgenommen, nach Augenmaß mit 400 bis 600 ml Puffer (3) auf die gewünschte Chloroplastenkonzentration verdünnt und im Kühlschrank bei +3 bis +4°C aufbewahrt. Die Isolierung dauerte vom Beginn des Blattschneidens an gerechnet meistens 1 ½ bis 1 3/4 Stunden.

Die Chloroplasten waren zu 50 bis 70 % intakt (intakte Chloroplasten leuchten im Phasenkontrastmikroskop hell auf - vergleiche Ridley and Leech 1969).

D. Chlorophyllbestimmung

Zur Bestimmung der Chlorophyllkonzentration wurden unmittelbar vor Beginn jedes Versuches 3 ml Chloroplastensuspension aus dem Reaktionsgefäß (Abb.3, S.13) entnommen. Die Chloroplastensuspension wurde in einem 10-ml-Zentrifugenglas mit destilliertem Wasser zum Waschen verdünnt und 15 Minuten mit 2000 g zentrifugiert; die überstehende Lösung wurde dekantiert. Das Sediment, die Chloroplasten, wurden in 80 %igem Aceton suspendiert und zur vollständigen Extraktion der Pigmente ca. 1 Stunde in den Kühlschrank gestellt. Danach wurde die Suspension wieder 15 Minuten mit 2000 g zentrifugiert. Der Überstand, der Chloroplastengesamtextrakt, wurde quantitativ in 5 ml- oder 10 ml-Meßkölbchen übergeführt - je nach Konzentration der Lösung - und mit 80 %igem Aceton bis zur Marke aufgefüllt. Das Absorptionsspektrum des Gesamtextraktes wurde mit einem registrierenden Zeiss Spektralphotometer RPQ 20 AV im Bereich von 670 nm bis 620 nm gemessen. (Das Spektralphotometer ist mit einem Gittermonochromator M19 ausgestattet; die spektrale Auflösung ist deshalb im langwelligen Bereich sehr gut). Die effektive Schichtdicke war 1 cm.

Die Gesamtchlorophyllkonzentration c wurde aus den Extinktionen A_{663} und A_{645} in den Absorptionsmaxima von Chlorophyll a und b nach einer Formel von Arnon (1949) berechnet:

$$c \text{ (mg Chlorophyll/l)} = 20{,}2 \cdot A_{645} + 8{,}0 \cdot A_{663}$$

(Extinktionen A_{645} und A_{663} bei 1 cm Schichtdicke). Die Koeffizienten 20,2 und 8,0 ergeben sich aus den vier Extinktionskoeffizienten+) von Chlorophyll a und b bei 663 nm und 645 nm.

+) (bestimmt von Mackinney 1941)

E. Versuchsanordnung

Zur Bestimmung der Hill-Aktivität wurde die Abnahme der DCPIP-Konzentration spektralphotometrisch gemessen. Das Kernstück der Meßanordnung ist deshalb ein registrierendes Spektralphotometer (Zeiss RPQ 20 AV mit Gittermonochromator M19).

Um die Schwierigkeiten zu umgehen, die sich bei Bestrahlung und Messung der Absorption in der gleichen Küvette ergeben können, wurden Reaktionsraum und Meßraum voneinander getrennt.

Die Meßanordnung geht aus Abb. 1 und 2 hervor: Eine Chloroplastensuspension wird in einem Reaktionsgefäß aus Plexiglas bestrahlt. Die Extinktion wird in einer Durchflußküvette gemessen, die über ein Pumpsystem an das Reaktionsgefäß angeschlossen ist. Die Streuung des Lichts durch die Chloroplasten wurde dadurch kompensiert, daß als Vergleichslösung eine Chloroplastensuspension der gleichen Konzentration verwendet wurde.

1. Umpumpsystem

Reaktionsraum und Meßraum sind voneinander getrennt; Meß- und Vergleichslösungen müssen also ständig umgepumpt werden. Die Einzelteile des in Abbildung 2 schematisch dargestellten Umpumpsystems sollen im folgenden beschrieben werden.

1.1. Reaktionsgefäß und Zubehör

Das Reaktionsgefäß (Abb.3) aus Plexiglas hat eine Schichtdicke von 1 cm. Es hat im unteren Teil einen runden Querschnitt; dadurch wird die Zirkulation gefördert und ein Absetzen von Chloroplasten in Ecken ausgeschlossen. Das Reaktionsgefäß hat drei Schlifföffnungen:

1. ein NS 7,5 für eine 15 ml Bürette mit 0,05 ml Teilung. Ein kleiner Aufsatz auf der Bürette, durch den ständig

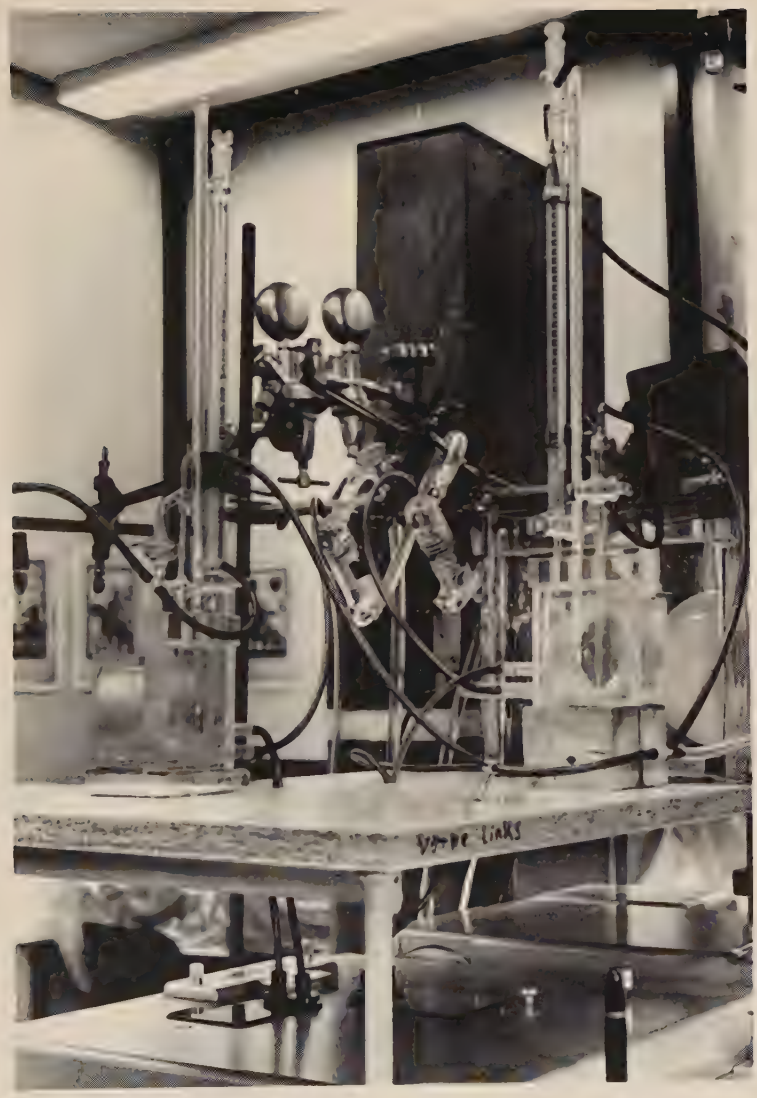
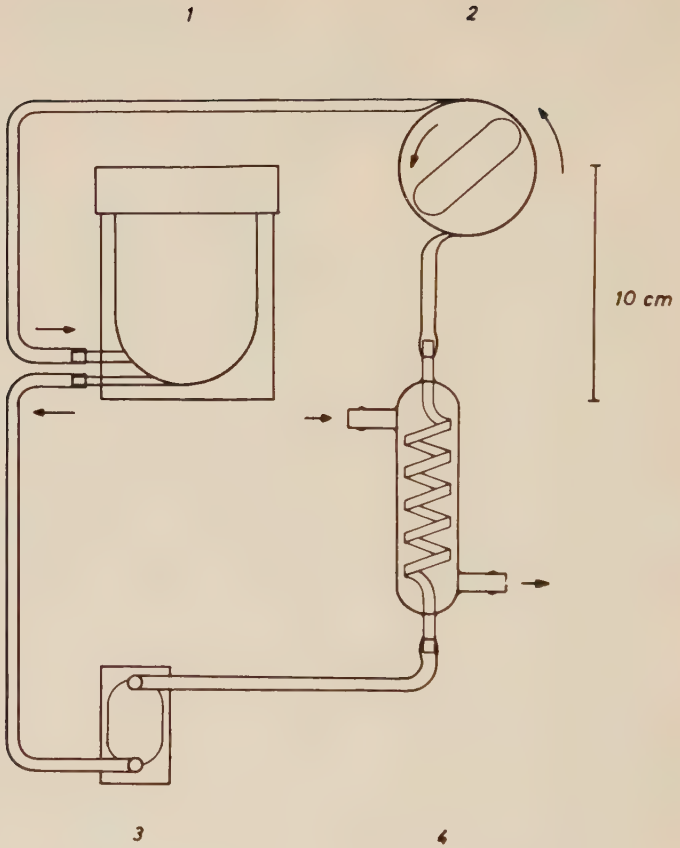


Abb.1: Gesamtansicht der Apparatur: Unten das Spektralphotometer, oben - auf einer Platte - rechts das Reaktionsgefäß mit der Meßsuspension, links ein gleiches Gefäß mit der Vergleichssuspension, in der Mitte die beiden Kühler.



1 Reaktionsgefäß
2 Schlauchquetschpumpe
3 Durchflußküvette
4 Kühler

Abb.2: Schematische Darstellung des Umpumpsystems

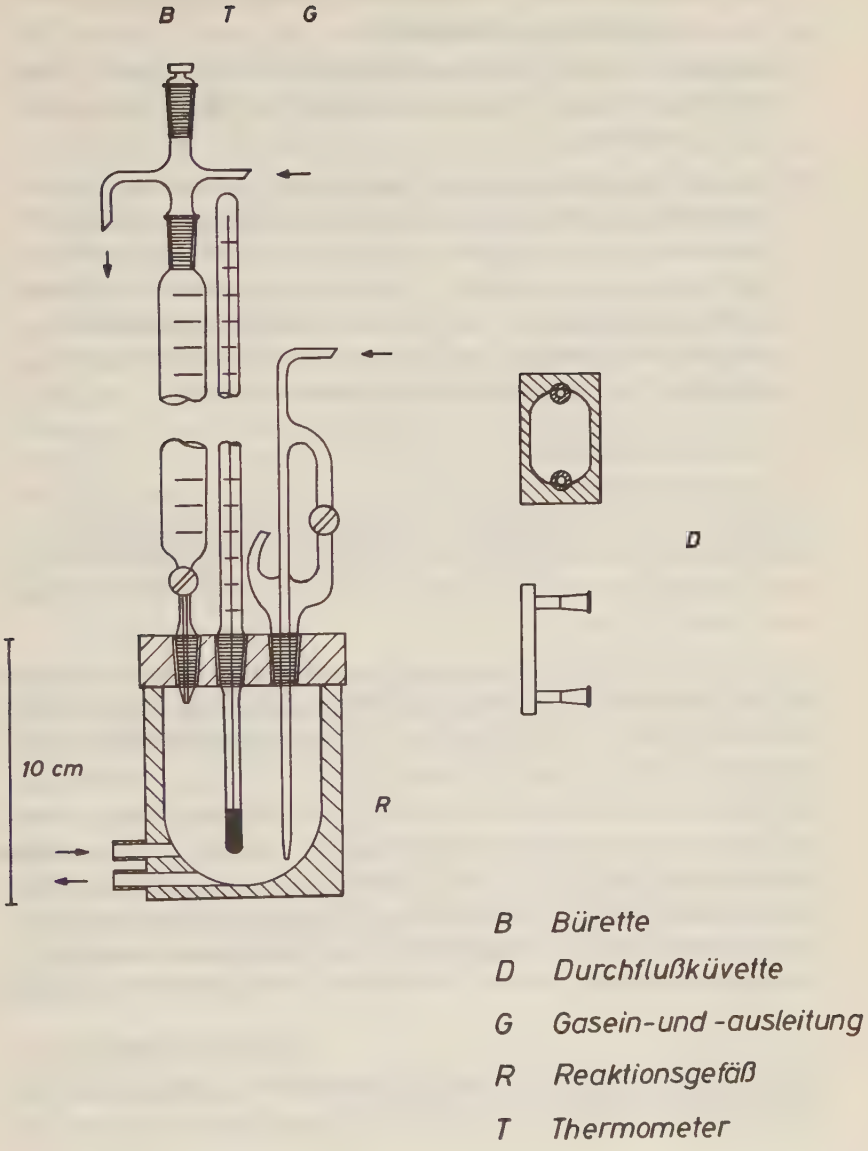


Abb.3: Reaktionsgefäß mit Zubehör, Durchflußküvette

Gas geleitet wird, ermöglicht die Zugabe von DCPIP unter definierter Gasatmosphäre;

2. ein NS 10 für ein Schlifthermometer, 0 bis +50°C, mit 1/10 Gradteilung (Sonderanfertigung der Fa. Koch & Kranich, Wertheim);

3. ein NS 10 zur Gasein- und ausleitung. Öffnet man den seitlichen Hahn, so wird das Gas über die Suspension geleitet; schließt man den Hahn, so wird das Gas durch die Suspension geleitet - dadurch wird zusätzlich zum ständigen Umpumpen für eine gute Durchmischung der Suspension gesorgt. Das Reaktionsgefäß hat unten zwei Stutzen für den Anschluß des Umpumpsystems.

1.2. Durchflußküvetten

Die Durchflußküvetten (Abb.3) aus Glas haben eine Schichtdicke von 3 mm (Spezialanfertigung der Fa. Hellma, Müllheim/Baden). Im Zeiss RPQ 20 AV werden die Küvetten zweimal vom Lichtstrahl durchsetzt; die effektive Schichtdicke ist deshalb 6 mm.

Für Transmissionsmessungen wurden speziell gebaute Küvettenhalter verwendet; die Metalldeckel der Küvettenräume wurden durch PVC-Deckel mit Öffnungen für Schlauchdurchführungen ersetzt.

Für Messungen in Remission wurden die Küvetten in PVC-Rahmen auf den Remissionsaufsatz (RA 20) gelegt. Je eine Milchglasplatte (25 x 30 x 3 mm)[+)] wurde als diffus streuender Hintergrund hinter der Küvette mit an dem Remissionsaufsatz vorhandenen Federn festgedrückt. In das Gehäuse des Remissionsaufsatzes wurden lichtdichte Schlauchdurchführungen eingebaut.

[+)] Geschenk der Fa. Link, Wertheim

1.3. Schlauchquetschpumpe

Bei der Wahl einer Pumpe zum Umpumpen der Chloroplasten muß man berücksichtigen, daß Chloroplasten gegen Schwermetallionen sehr empfindlich sind.

Es wurde eine Minischlauchpumpe (Fa. Schwinherr, Schwäbisch Gmünd) verwendet, bei der vom gleichen Motor und vom gleichen Getriebe zwei Pumpenköpfe bewegt werden, sodaß die Meß- und Vergleichschloroplastensuspension gleich schnell umgepumpt werden.

Es wurden Viton-B-Schläuche ($\varnothing_i$ = 3 mm) verwendet. Dieses Material zeichnet sich durch seine Indifferenz gegenüber wäßrigen Lösungen und durch eine geringe Sauerstoffdurchlässigkeit aus. Die Umpumpgeschwindigkeit war ca. 250 ml/Minute.

Die durch die Pumpe führenden Schlauchteile werden mechanisch stark beansprucht. Sie wurden deshalb jeweils nach 10 bis 12 Stunden Dauerbetrieb erneuert.

1.4. Kühler

Um bei definierter Temperatur messen zu können, wurde je ein kleiner Schlangenkühler in das Umpumpsystem eingebaut. Die Kühler wurden an die Umwälzpumpe eines Thermostaten angeschlossen, der je nach Temperaturbereich mit Leitungswasser oder über den Außenumlauf eines Kryostaten gekühlt wurde.

Bei einer frisch eingefüllten Chloroplastensuspension (40 ml) stellte sich eine gewünschte Temperatur bei einer Umpumpgeschwindigkeit von 250 ml/Minute in 1 bis 2 Minuten ein.

1.5. Volumenkorrektur

Bei der gewählten Meßanordnung und einem Gesamtvolumen von ca. 45 ml befindet sich ein Drittel der Chloroplastensuspen-

sion im Dunkeln (in Meßküvette und Schläuchen). Würde die gesamte Suspension bestrahlt, dann würde man um den Faktor 1,5 höhere Hill-Aktivitäten beobachten. In dieser Arbeit wurden meistens nur Relativwerte der Hill-Aktivität benötigt; auf eine Korrektur der Hill-Aktivitäten wurde deshalb verzichtet. Nur in der Diskussion, in der eigene Meßwerte mit den Meßergebnissen anderer Autoren verglichen werden, wurden die gemessenen Hill-Aktivitäten mit dem Faktor 1,5 multipliziert.

2. Gasmischanlage

Verwendete Gase und Ventile:

a) N_2 (Gasflasche) wurde mit reduziertem BTS-Kupfer-Katalysator nachgereinigt. Druckminderventil bis 2,5 at. mit Feinstellventil (Fa. Messer, Griesheim)

b) O_2 (Gasflasche), Druckminderventil mit Feinstellventil (Fa. Messer, Griesheim)

c) Preßluft (Gasflasche), Feinstellventil für Edelgase (Fa. Balzers, Type RNV 27H).

In der improvisierten Gasmischanlage (Abb.4) wurde mit einem 1 l - Meßzylinder jeweils gemessen, wieviel Wasser pro Zeiteinheit ein Gas bei einer bestimmten Einstellung des Ventils verdrängt. Während einer solchen Messung wurde der Wasserspiegel des Niveaugefäßes (bei geöffnetem Hahn!) ständig auf die Höhe des Wasserspiegels im Meßzylinder gebracht.

Aus dem jeweiligen Mischungsverhältnis der Gase kann der O_2-Gehalt der Mischung berechnet werden.

3. Lichtquelle

Als Lichtquelle wurde eine Osram 500-Watt-Lampe (Nitraphot) verwendet, die mit einer Stativklammer an einem waagrecht eingebauten Stativ befestigt ist. Der Abstand zwischen Licht-

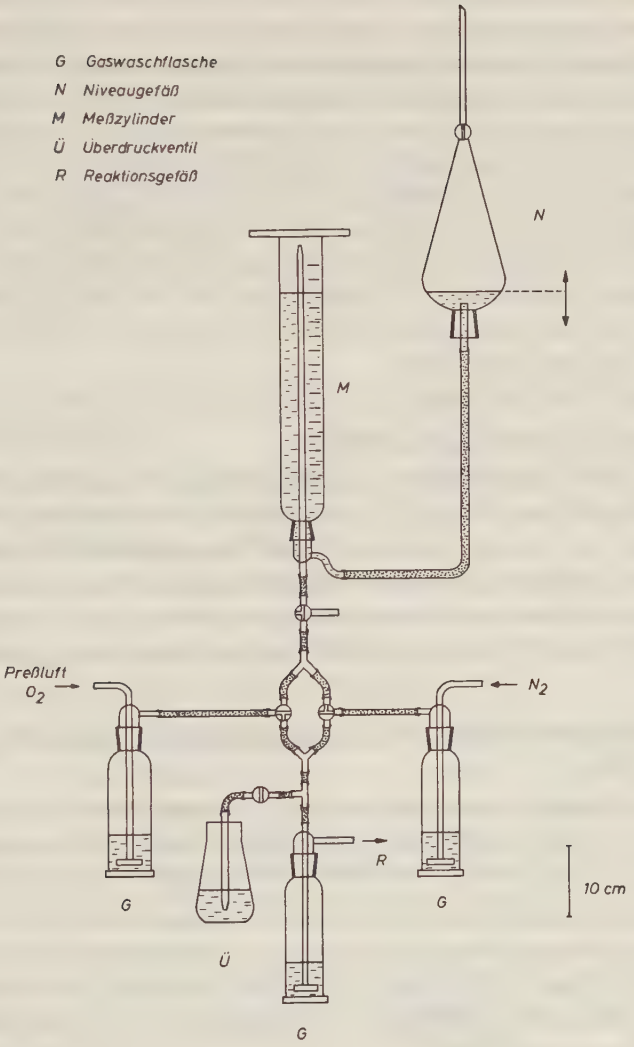


Abb.4: Gasmischanlage

quelle und Reaktionsgefäß ließ sich kontinuierlich verstellen. Er betrug meistens ca. 20 cm; die Beleuchtungsintensität im Reaktionsgefäß betrug dann ca. 70 000 Lux. Die Beleuchtungsintensität wurde direkt hinter dem mit Wasser gefüllten Reaktionsgefäß mit einem Lange-Luxmeter gemessen. Die Lampe wurde mit zwei Ventilatoren gekühlt. Außerdem befand sich zwischen Lampe und Reaktionsgefäß eine Küvette mit Wasser (Schichttiefe 5 cm), die einen großen Teil der Wärmestrahlung absorbierte. Die Chloroplastensuspension erwärmte sich bei der Bestrahlung nur geringfügig: Bei unterbrochener Belichtung (30 sec Licht, 90 sec Dunkel) maximal um 0,4°C, bei kontinuierlicher Belichtung (4 bis 8 Minuten Licht) maximal um 1,0°C.

4. Empfindlichkeit der Anzeige

Gibt man zu einer Chloroplastensuspension eine konzentrierte DCPIP-Lösung, die z.B. eine Extinktionsänderung von 0,9 bewirkt, so stellt sich bei einer Umpumpgeschwindigkeit von ca. 250 ml/Minute die neue Extinktion in 12 sec ein. Nach dem Anschalten des Lichts wurde der Beginn der Abnahme der Extinktion mit einer Verzögerung von etwa 2 sec registriert.

F. Versuchsanordnung für die elektrochemische Reduktion von DCPIP

Um die Rückoxidation von $DCPIPH_2$ in einem übersichtlichen System messen zu können, wurde DCPIP nicht photochemisch, durch Chloroplasten, sondern elektrochemisch reduziert.

Als Arbeitselektrode wurde eine Platinnetzelektrode verwendet, als Gegenelektrode eine gesättigte Kalomelelektrode. Beide Systeme wurden durch eine KCl-Elektrolytbrücke, deren eines Ende mit gesättigter KCl-Lösung und 3 %igem Agar gefüllt war, verbunden.

Als Spannungsquelle diente eine Taschenlampenbatterie (4 V). Die Stromstärke wurde mit einem Drehwiderstand auf ca. 1 mA eingestellt.

Während der Reduktion wurde Stickstoff durchgeleitet und die Lösung mit einem Magnetrührer kräftig gerührt.

Um Nebenreaktionen des sonst verwendeten Puffergemisches (3) während der Reduktion auszuschließen, wurde eine konzentrierte DCPIP-Lösung, ca. $1 \cdot 10^{-3}$ molar, in m/15 Phosphatpuffer reduziert. Unter diesen Bedingungen wurden 80 ml konzentrierte Farbstofflösung in 3 bis 4 Stunden vollständig entfärbt.

G. Berechnung der Löslichkeit von Sauerstoff im verwendeten Puffergemisch [+)]

Das verwendete Puffergemisch (3) enthält pro Liter 0,45 Mol Rohrzucker und 0,106 Mol Salze (NaCl, $MgCl_2$, NaOH, TRIS, Maleinsäure) gelöst - vergl. C.

Aus der Arbeit von Mac Arthur (1916) kann man die Löslichkeit von Luftsauerstoff in Salz- bzw. Rohrzuckerlösungen verschiedener Molarität bei 25°C entnehmen. Durch Interpolation erhält man folgende Löslichkeiten:

0,106 m Elektrolyte	——	5,49 ml O_2/1 l
0,45 m Rohrzucker	——	4,48 ml O_2/1 l
reines Wasser	——	5,78 ml O_2/1 l

Nimmt man an, daß sich die Abnahme der O_2-Löslichkeit in einer Lösung von Rohrzucker und Salzen additiv verhält, so

---

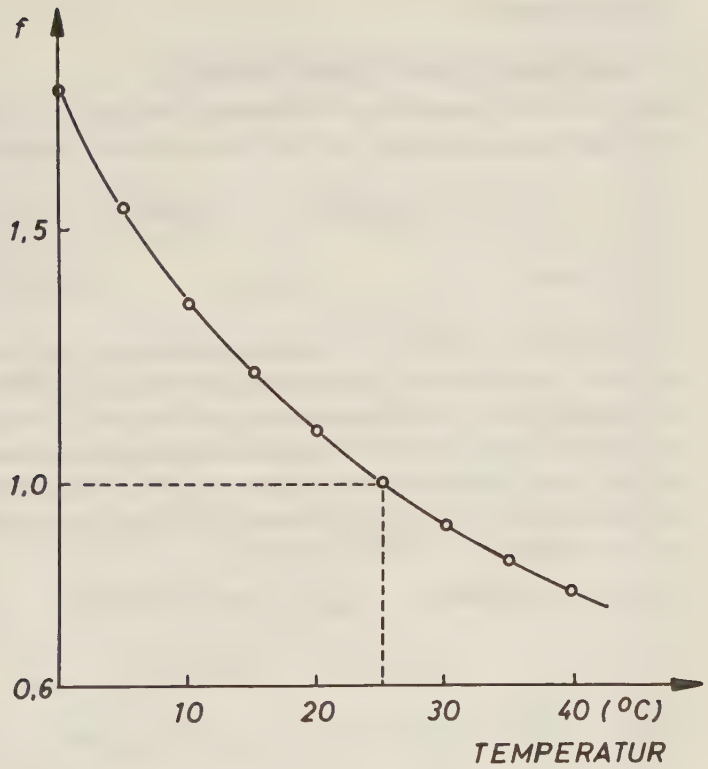
+) Angaben über die Löslichkeit von Sauerstoff und anderen Gasen in Elektrolyten und Nichtelektrolyten finden sich in dem Review-Artikel von Battino (1966).

enthält das verwendete Puffergemisch (3) bei 25°C 4,19 ml O_2/1l gelöst (bezogen auf 760 Torr und 0°C).

Da Mac Arthur (1916) seine Angaben auf Luft und nicht auf reinen Sauerstoff bezieht, muß die gelöste Menge Sauerstoff mit 100/21 multipliziert werden. Man erhält für reinen Sauerstoff 4,19·100/21 ml O_2/l = 19,97 ml O_2/l. Nach der allgemeinen Gasgleichung ergibt sich, daß 19,97 ml O_2/l 28,5 mg O_2/1l entsprechen. Das verwendete Puffergemisch (3) löst also bei 25°C $8{,}9 \cdot 10^{-4}$ Mol O_2/l (O_2-Partialdruck = 760 Torr - Wasserdampfdruck).

Die Temperaturabhängigkeit der Sauerstofflöslichkeit im verwendeten Puffergemisch ist nicht bekannt. Es wurde deshalb angenommen, daß die Temperaturabhängigkeit der O_2-Löslichkeit in reinem Wasser und in der Pufferlösung gleich ist. Angaben über die Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser findet man z.B. im Handbook of Chemistry and Physics (1957). In Abb.5 ist die relative Löslichkeit von Sauerstoff in reinem Wasser bezogen auf die Löslichkeit bei 25°C dargestellt (bei den Angaben ist $P_{O_2} + P_{H_2O} = 760$ Torr).
Bei anderen Temperaturen als 25°C muß die Löslichkeit von Sauerstoff in dem Puffergemisch (3) bei 25°C nur mit dem entsprechenden Faktor aus Abb.5 multipliziert werden.

Die nach diesem Verfahren berechnete Löslichkeit von Sauerstoff in Rohrzuckerlösungen stimmt mit den von Müller (1913) bei 15°C und 20°C gemessenen Werten auf 5 bis 10 % überein.



$$f = \frac{\text{mg } O_2/l \ (t^{\circ}C)}{\text{mg } O_2/l \ (25^{\circ}C)}$$

Abb.5: Relative Löslichkeit f von Sauerstoff in Wasser, bezogen auf 25°C

III. EXPERIMENTELLER TEIL

A. Vorversuche

1. Eigenschaften des Farbstoffs DCPIP

DCPIP ist eine amphotere Verbindung. Es kann als Kation AH_2^+ oder als Neutralmolekül AH oder als Anion A^- vorliegen:

$$A^- + H^+ \rightleftharpoons AH \underset{-H^+}{\overset{+H^+}{\rightleftharpoons}} AH_2^+$$

blau rosa farblos

In unserem Falle (pH ≈ 7) interessierte nur das erste Gleichgewicht. Es wurde das Absorptionsspektrum von DCPIP bei 26°C in Abhängigkeit vom pH gemessen. Als Puffer diente m/15 Phosphatpuffer verschiedener Zusammensetzung. Der genaue pH wurde mit einer Glaselektrode gemessen. Die Meßergebnisse sind in Abb.6 dargestellt. Sie stimmen sehr gut mit den Ergebnissen von Armstrong (1964) überein:

Für das Gleichgewicht $A^- + H^+ \overset{K_a}{\rightleftharpoons} AH$ gilt

$$[A^-] \cdot [H^+] / [AH] = K_a \qquad (1)$$

Mit $[A^-] + [AH] = c_o$ und $-\log_{10} K_a \equiv pK_a$ folgt

$$[A^-] = c_o/(1 + \frac{[H^+]}{K_a}) = c_o/(1 + 10^{(pK_a - pH)}) \qquad (2)$$

Für die Extinktion gilt bei 1 cm Schichtdicke

$$E = \varepsilon_{AH} \cdot [AH] + \varepsilon_{A^-} \cdot [A^-] \qquad (3)$$

$$E = \varepsilon_{AH} \cdot c_o + (\varepsilon_{A^-} - \varepsilon_{AH}) \cdot [A^-] \qquad (4)$$

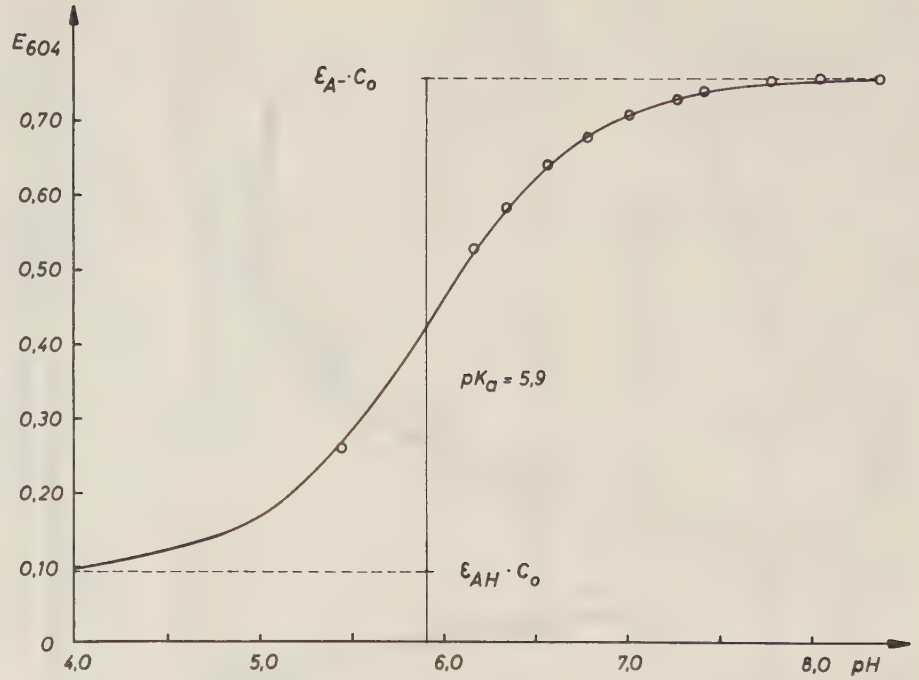


Abb.6: Absorption von DCPIP bei 604 nm (Absorptionsmaximum) in Abhängigkeit vom pH. Die den Meßpunkten zugrunde liegenden Absorptionsspektren sind z.T. in Abb.6a wiedergegeben. Die ausgezogene Kurve wurde nach Gleichung (5) berechnet.

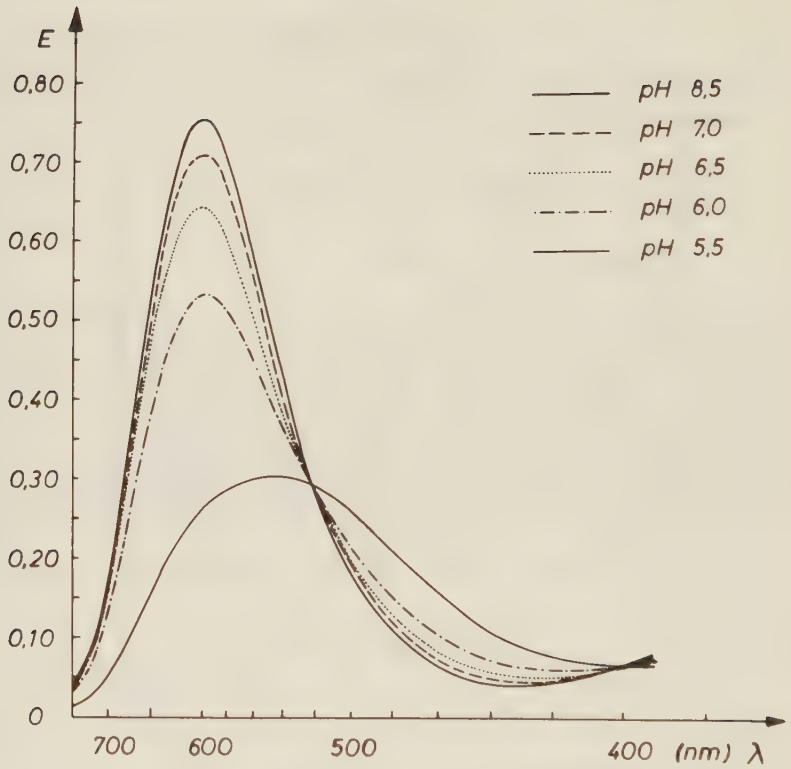


Abb.6a: Absorptionsspektren von DCPIP bei verschiedenem pH (m/15 Phosphatpuffer); [DCPIP] = $4{,}01 \cdot 10^{-5}$ Mol/l, d = 1 cm.

Für die Abhängigkeit der Extinktion vom pH ergibt sich damit aus (4) und (2)

$$E = \varepsilon_{A^-} \cdot c_o \cdot \left[\frac{1 - \varepsilon_{HA}/\varepsilon_{A^-}}{1 + 10^{(pK_a - pH)}} + \frac{\varepsilon_{HA}}{\varepsilon_{A^-}} \right] \qquad (5)$$

Für $\varepsilon_{HA}/\varepsilon_{A^-}$ bei 604 nm wurden die Daten von Armstrong (1964) für 610 nm benutzt:

$$\frac{\varepsilon_{AH}}{\varepsilon_{A^-}} = \frac{2{,}7 \cdot 10^3}{2{,}2 \cdot 10^4} = 0{,}123$$

Mit diesem Wert findet man für die Extinktion $E_{1/2}$ im Äquivalenzpunkt ($[AH] = [A^-]$):

$$E_{1/2} = \frac{c_o}{2} (\varepsilon_{AH} + \varepsilon_{A^-}) = \frac{A^- \cdot c_o}{2} \left(1 + \frac{\varepsilon_{AH}}{\varepsilon_{A^-}} \right)$$

$$= \frac{1}{2} E_{max} \left(1 + \frac{\varepsilon_{AH}}{\varepsilon_{A^-}}\right) \qquad (6)$$

Aus $E_{max} = 0{,}760$ (Abb.6) folgt nach (6) $E_{1/2} = 0{,}427$. Schließlich gilt im Äquivalenzpunkt

$$pK_a = pH \qquad (7)$$

Abb.6 wurde entnommen $pK_a = 5{,}88 \pm 0{,}02$ (vgl. Armstrong (1964): $pK_a = 5{,}90 \pm 0{,}02$). Die Ausgezogene Kurve in Abb.6 wurde nach Gleichung (5) berechnet mit

$$\varepsilon_{A^-} \cdot c_o = E_{max} = 0{,}76$$

$$pK_a = 5{,}9$$

$$\varepsilon_{HA}/\varepsilon_{A^-} = 0{,}123$$

Die gemessenen Extinktionswerte liegen innerhalb der Meßgenauigkeit auf der berechneten Kurve.

Aus Abb.6 bzw. aus $pK_a = 5{,}9$ folgt, daß bei einer Meßgenauigkeit von 1 % für pH < 8 der Extinktionskoeffizient von DCPIP nicht mehr unabhängig vom pH ist. Aus Gleichung (5) folgt für 1 cm Schichtdicke:

$$\varepsilon_{DCPIP} = \frac{E}{c_o} = \frac{\varepsilon_{A^-} - \varepsilon_{HA}}{1 + 10^{(pK_a - pH)}} + \varepsilon_{AH}$$

Der gemessene Extinktionskoeffizient ε_{DCPIP} (Abb.7) liegt in dem Bereich der von anderen Autoren gemessenen Werte:

pH	ε_{DCPIP} [l Mol^{-1} cm^{-1}]	Autor
7,0	$16{,}1 \cdot 10^3$	Crane et al.(1956)+)
	17,7	vorliegende Arbeit
	19,1	Basford et al.(1955) +)
	20,2-21,0	Steyn-Parvé et al. (1959) +)
	20,6	Armstrong (1964)
	20,9	Punnett (1959)

(Die mit +) bezeichneten Angaben sind der Arbeit von Armstrong (1964) entnommen).

Die relativ großen Unterschiede sind nach Armstrong (1964) zum größten Teil auf den schwankenden Kristallwassergehalt der verwendeten DCPIP-Präparate zurückzuführen. Bei der Berechnung des Extinktionskoeffizienten wurde das Molekulargewicht MG = 290 zugrundegelegt. Berücksichtigt man noch 2 H_2O Kristallwasser, dann folgt MG = 326 und ε_{DCPIP} (pH 7) = 19,9 l/Mol·cm. Allen Rechnungen in dieser Arbeit liegt aber das Molekulargewicht MG = 290 zugrunde. Es wurde immer das

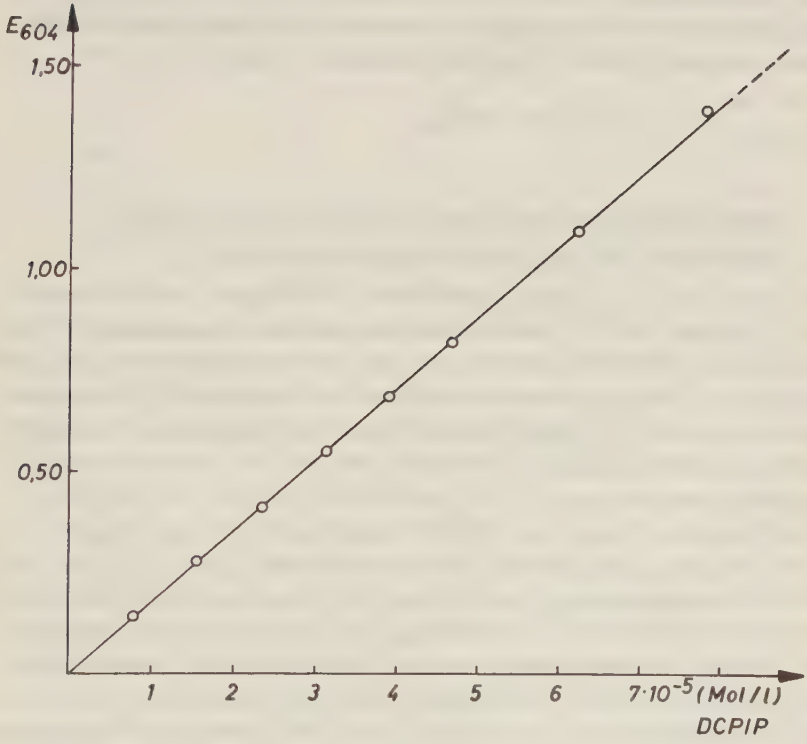


Abb.7: Proportionalität von Extinktion und Konzentration von DCPIP bei 604 nm, d = 1 cm, pH = 7,0 (m/15 Phosphatpuffer): $\varepsilon_{604} = 1{,}77 \cdot 10^4\ l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}$.

gleiche DCPIP-Präparat verwendet.

Die effektive Schichtdicke der verwendeten Durchflußküvetten war nicht genau 0,6 cm. Der Einfachheit halber wurde nicht die Schichtdicke korrigiert, sondern ein korrigierter Wert des Extinktionskoeffizienten verwendet, bei pH 7,5:

$\varepsilon^{604\ nm}_{DCPIP} = 16{,}7 \cdot 10^3$ l/Mol·cm.

2. Proportionalität zwischen DCPIP-Konzentration und Extinktion in der verwendeten Meßanordnung

Es wurde für die Durchflußküvetten (effektive Schichtdicke ca. 0,6 cm) in der angegebenen Meßanordnung nachgeprüft, bis zu welcher DCPIP-Konzentration die Extinktion bei 604 nm proportional der DCPIP-Konzentration ist. Konzentrationsreihen mit Farbstoff in reinem Puffer, bzw. in Chloroplastensuspension in einer häufig verwendeten Dichte (16 mg Chlorophyll/l) zeigen, daß bis zu $1{,}6 \cdot 10^{-4}$ Mol DCPIP/l (E = 1,6) die Extinktion bei 604 nm der DCPIP-Konzentration proportional ist (Abb.8a). Bei höheren Konzentrationen (E > 1,6) sind die Extinktionsmessungen nicht mehr zuverlässig; vor allem kann der Streulichtanteil des Meßlichtes (Einfachmonochromator!) nicht mehr vernachlässigt werden. Abb.8a zeigt ferner, daß die Absorption des Farbstoffs durch die Anwesenheit von Chloroplasten nicht verfälscht wird, wenn man als Vergleichslösung ebenfalls eine Chloroplastensuspension verwendet.
In Remission ist bei der gegebenen Meßanordnung die Extinktionszunahme nur bis $8 \cdot 10^{-5}$ Mol DCPIP/l der Farbstoffkonzentration proportional (Abb.8b). Bei höheren Konzentrationen tritt eine starke Abweichung durch Spiegelwirkung auf. Prinzipiell könnte man im linearen Bereich die Hill-Aktivität mit dieser Meßanordnung auch in Remission messen. Man müßte nur einen anderen effektiven Extinktionskoeffizienten benutzen. Es wurde aber nicht untersucht, ob und wie dieser Extinktionskoeffizient von der Chloroplastenkonzentration abhängt.

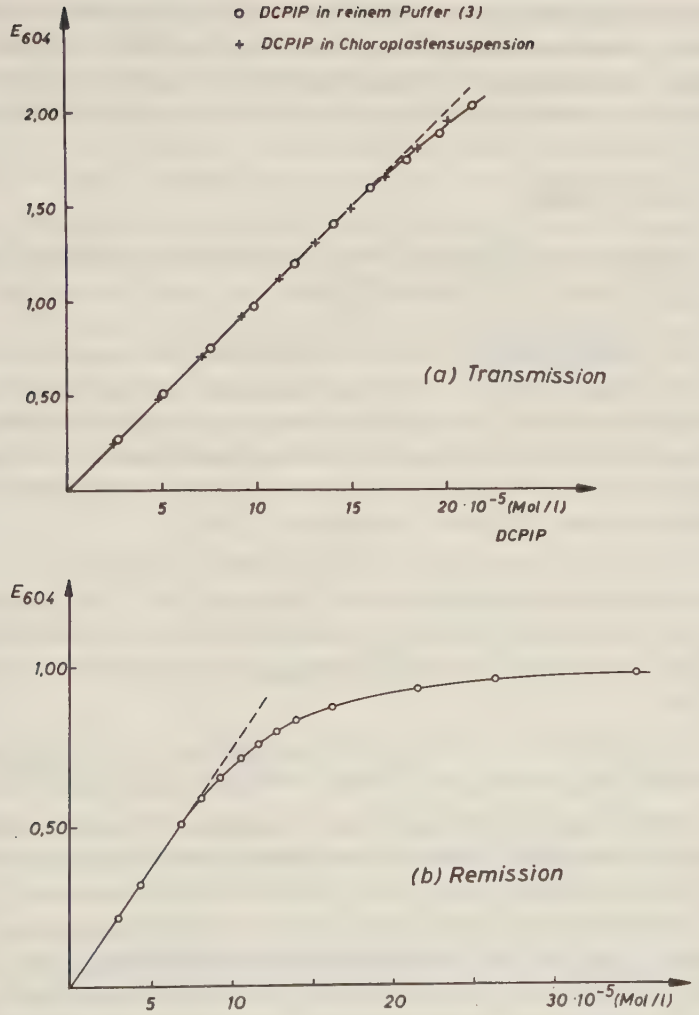


Abb.8a,b: Proportionalität von DCPIP-Konzentration und Extinktion in der verwendeten Meßanordnung:
a) in Transmission, b) in Remission;
pH = 7,6 (Puffer (3) - siehe S.8), d = 6 mm.

Alle Hill-Aktivitätsmessungen wurden in Transmission durchgeführt, da, abgesehen davon, daß das Spektralphotometer ständig von Transmission auf Remission umgebaut werden müßte, eine Messung in Remission bei der Verwendung von Chloroplasten keinerlei Vorteile bringt (vgl. Abb.8a und 8b).

B. Hauptversuche

1. Messung der Hill-Aktivität unter Berücksichtigung der der Rückoxidation von $DCPIPH_2$

1.1. Versuchsdurchführung und Auswertung

Bei der Durchführung von Serienmessungen können die Umpumpsysteme nicht für jeden neuen Versuch getrocknet werden; sie werden mehrfach mit bidestilliertem Wasser gespült und mit einer Wasserstrahlpumpe leer gesaugt. Das Restvolumen in Schläuchen und Küvetten beträgt ca. 3 ml.

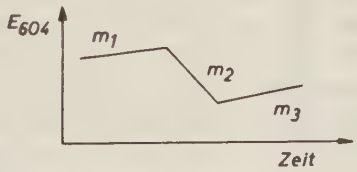
Je 40 ml Chloroplastensuspension werden in das Meß- bzw. Vergleichsystem eingefüllt und umgepumpt. Je 3 ml werden zur Bestimmung der effektiven Chlorophyllkonzentration entnommen. Alle weiteren Operationen werden im Dunkeln durchgeführt.

Um eine definierte Sauerstoffkonzentration in der Suspension herzustellen, wurde Gas - meist Preßluft - durchgeleitet.

Nach dem Abgleich von Null- und Hundertpunkt bei 604 nm für Transmission wird konzentrierte Farbstofflösung aus der Bürette zugegeben, bis die Extinktion bei 604 nm ca. 0,9 ist. Im Vergleichsystem wird eine entsprechende Menge Puffer zugegeben, um gleiche Chloroplastenkonzentration in Meß- und Vergleichsystem zu behalten. (Bei der Berechnung der Chlorophyllkonzentration wurde stets die Verdünnung der Chloroplastensuspension durch Zugabe von DCPIP, bzw. Puffer berücksichtigt).

Etwa 1 bis 2 Minuten, nachdem sich eine konstante Extinktion eingestellt hat, wird die Lampe eingeschaltet. Die Extinktion nimmt ab. Nach 30 bis 60 Sekunden wird die Lampe ausgeschaltet. Man beobachtet einen langsamen Wiederanstieg der Extinktion: Der reduzierte Farbstoff wird rückoxidiert. Nach 1 bis 2 Minuten wird die Lampe wieder angeschaltet: Eine erneute Abnahme der Extinktion wird beobachtet, u.s.w.

Die einzelnen Kurvenstücke sind innerhalb der Meßgenauigkeit linear. Es wurden durch sie Geraden gelegt und deren Steigung bestimmt. Zur Berechnung der Hill-Aktivität muß die Steigung der Reduktionskurvenstücke korrigiert werden, weil der Reduktion eine gleichzeitige Rückoxidation des reduzierten Farbstoffs überlagert ist. Von der Steigung des Reduktionskurvenstückes wurde daher der Mittelwert der Steigung des vorhergehenden und des folgenden Rückoxidationskurvenstücks substrahiert. Z.B.



$$(m_2)_{\text{korrigiert}} = m_2 - \frac{1}{2}(m_1 + m_3)$$

Abb.9 zeigt ein typisches Beispiel für die Durchführung und Auswertung einer Hill-Aktivitätsmessung. Die Hill-Aktivität wird angegeben in

$$\frac{\Delta\,[\text{DCPIP}]\ [\text{Mol/l}]}{\text{Chlorophyll}\ [\text{mg/l}] \cdot \Delta t\ [\text{Min.}]} = \text{Hill-Aktivität}$$

Bei der Messung der Rückoxidation muß es im Labor wirklich dunkel sein; mißt man nämlich bei "diffusem" Tageslicht, so kann die Rückoxidation je nach Wetter durch eine mehr oder

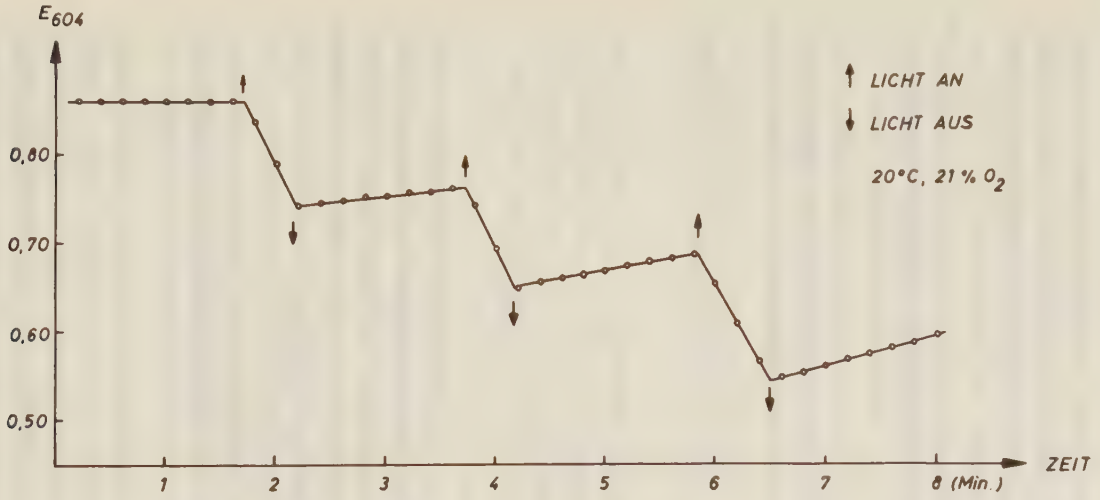


Abb.9: Auswertung einer Hill-Aktivitätsmessung, vergl. S.30. Steigung $\Delta E/\Delta t$ der aufeinanderfolgenden Kurvenstücke in $Min.^{-1}$:

$\Delta E/\Delta t$ 0,000 / -0,245 / 0,014 / -0,238 / 0,020 / -0,218 / 0,030

$(\Delta E/\Delta t)_{korr.}$: -0,252 -0,255 -0,247

Mittelwert von $(\Delta E/\Delta t)$: (0,250 ± 0,005) $Min.^{-1} \triangleq 0{,}250 \cdot 10^{-4}$ Mol DCPIP$\cdot l^{-1} \cdot Min.^{-1}$

Chlorophyllkonz.: 16,5 mg/l Hill-Aktivität: $15{,}1 \cdot 10^{-7}$ Mol DCPIP/(mg Chl.·Min.)

(Hinweis: Bei der Bestimmung der Hill-Aktivität nach diesem Verfahren sollte nicht mehr als 1/3 des DCPIP reduziert werden; bei weitgehender Reduktion nimmt $(\Delta E/\Delta t)_{korr.}$ merklich ab, weil die Reduktion von DCPIP keine reine Reaktion nullter Ordnung ist - vergl. S. 66 ff. Die Mittelwertbildung hat dann keinen Sinn mehr).

weniger geringe Reduktion verdeckt sein. Bei sehr schönem Wetter wurden im Labor ca. 1000 Lux gemessen - im "Dunkeln", bei ausgeschalteter Lampe, wurde sogar eine schwache Reduktion beobachtet. Vielleicht kann Jagendorf (1956) s.o. beim Arbeiten bei diffusem Tageslicht aus ähnlichem Grund nur eine extrem langsame, und seiner Meinung nach zu vernachlässigende Rückoxidation messen. Die Helligkeit bei der Messung der Rückoxidation betrug ca. 5 Lux.

Im folgenden wird unter der Reduktion immer die Änderung der Extinktion bei 604 nm beim Bestrahlen in Abhängigkeit von der Zeit verstanden, unter Rückoxidation die Änderung der Extinktion pro Zeit im Dunkeln bei 5 Lux.

1.2. Abhängigkeit der Hill-Aktivität der Chloroplasten von der Zeit nach dem Einfüllen

Bei höheren Temperaturen verlieren die Chloroplasten mehr oder weniger schnell ihre photochemische Aktivität. Sowohl für die Bestimmung der Hill-Aktivität als auch für die kinetische Beschreibung der Reduktion ist aber die Annahme wesentlich, daß die Aktivität der Chloroplasten wenigstens für die Dauer einiger Minuten praktisch konstant ist. Es wurde deshalb die Abnahme der Aktivität als Funktion von der Zeit nach dem Einfüllen der Chloroplasten in das Reaktionsgefäß untersucht. Der Zeitpunkt des Einfüllens fällt praktisch mit dem Zeitintervall (2 Min.) zusammen, in dem die Chloroplasten von 4°C auf die Reaktionstemperatur gebracht werden.

Wie Abb.10 zeigt, bleibt die Aktivität der Chloroplasten 10 bis 20 Minuten nach dem Einfüllen erhalten; anschließend nimmt die Aktivität je nach Temperatur und physiologischem Zustand der Chloroplasten ab. Man sollte also Aktivitätsmessungen spätestens 20 Minuten nach dem Einfüllen der Chloroplasten beendet haben.

Arbeitet man bei höheren Temperaturen, würde es sich empfehlen, zwei Thermostaten zu verwenden: Bei niederer Temperatur,

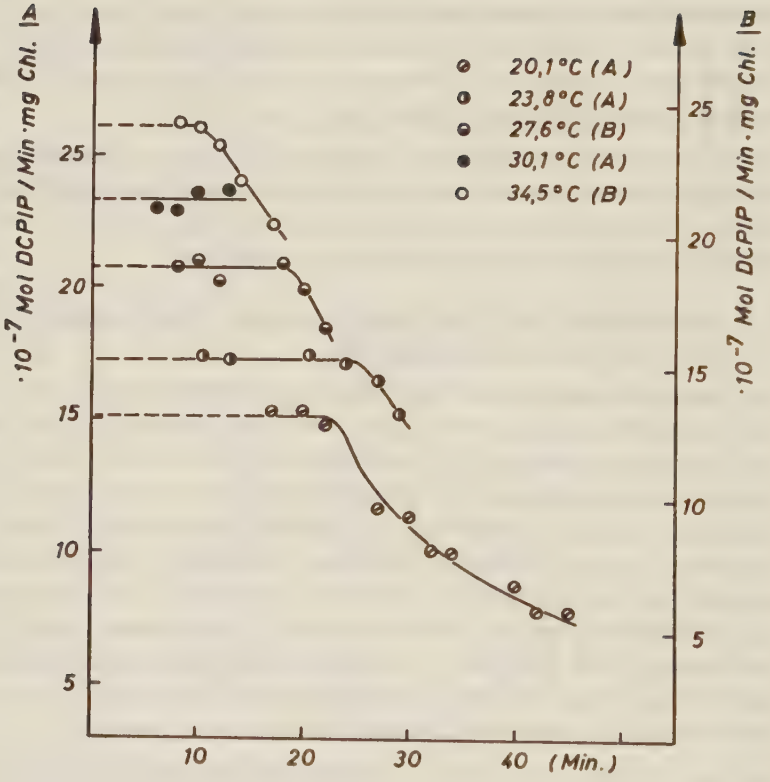


Abb.10: Abnahme der Hill-Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit nach dem Einfüllen der Chloroplasten. Der Übersicht halber sind bei 2 Kurven (B) die Ordinaten verschoben (21 % O_2, 70 000 Lux).

z.B. 15°C, nimmt man die Eichung des Spektralphotometers (0-100-Punkteinstellung) vor und beginnt, Gas durchzuleiten. Kurz vor Beginn der Messung schaltet man auf den zweiten Thermostaten um und bringt die Chloroplasten in ca. zwei Minuten auf die gewünschte Arbeitstemperatur.

1.3. Versuche zur Eichung des Meßverfahrens

Um das Meßverfahren zu überprüfen, wurden in Serienmessungen verschiedene Parameter der Reaktion, z.B. Chloroplastenkonzentration, Beleuchtungsintensität, Temperatur variiert, während die anderen Parameter auf optimalen Werten gehalten wurden.

Für jeden Meßpunkt einer Serie wurden je 40 ml Chloroplastensuspension neu eingefüllt.

Für Serienmessungen wurde eine größere Menge Chloroplasten isoliert, auf die gewünschte Konzentration verdünnt und im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt. Bei dieser Temperatur bleibt die Aktivität des Chloroplastenmaterials 5 bis 6 Stunden nach Beginn der Chloroplastenisolierung erhalten.

Nach 5 Stunden sollten Serienmessungen, denen gleiche Chloroplasten gleicher Aktivität zugrunde liegen sollen, beendet sein.

a) Abhängigkeit der Hill-Aktivität von der Chloroplastenkonzentration

Die Chloroplastenkonzentration wird durch die Chlorophyllkonzentration der entsprechenden Chloroplastensuspension bestimmt und in mg Chlorophyll pro l angegeben.

Die Abhängigkeit der Hill-Aktivität von der Chloroplastenkonzentration wurde bei einer Beleuchtungsintensität von 70 000 Lux, einer Temperatur von ca. 24°C und bei guter Durchmischung durch rasches Umpumpen der Suspension und Durchleiten von Preßluft gemessen. Abb.11 zeigt für einen

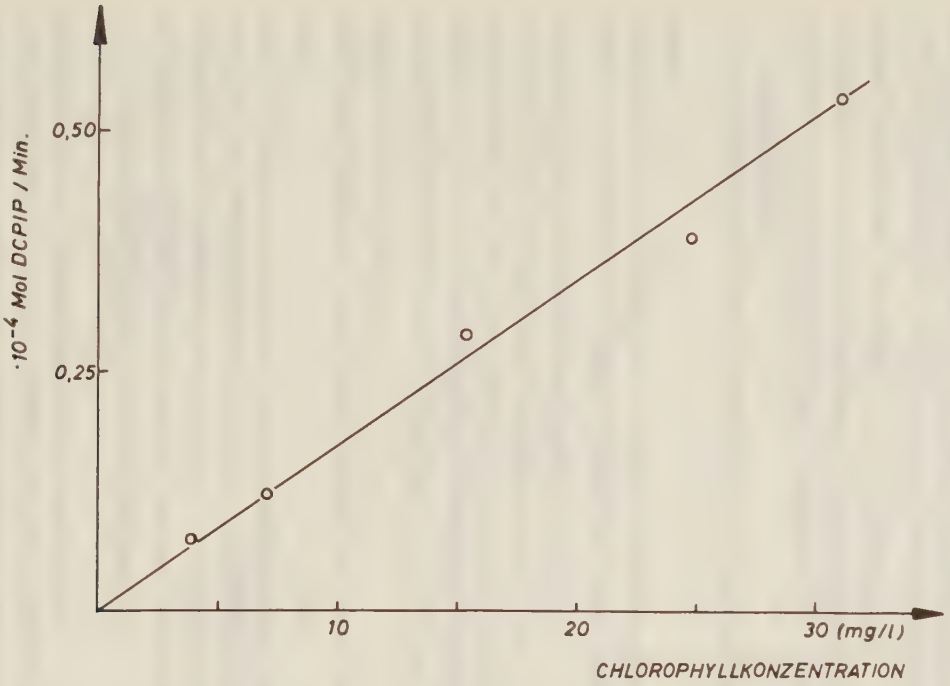


Abb.11: Abhängigkeit der Hill-Aktivität von der Chloroplastenkonzentration (23,8°C, 21 % O_2, 70 000 Lux)

von mehreren Versuchen, daß über einen großen Bereich die Hill-Reaktion proportional der Chloroplastenkonzentration ist, daß also die Hill-Reaktion in bezug auf die Chloroplastenkonzentration eine Reaktion 1. Ordnung ist (vergl. Spikes et al. 1950, Wessels 1954, Lumry, Wayrynen and Spikes 1957).

Außerdem zeigt Abb.11, daß bei Verwendung dieser Chloroplastenkonzentrationen im Lichtsättigungsbereich gearbeitet wird. Wäre das nicht der Fall, dann müßte bei hohen Chloroplastenkonzentrationen die Hill-Aktivität kleiner sein.

b) Abhängigkeit der Hill-Aktivität von der Beleuchtungsintensität

Die Beleuchtungsintensität kann durch Veränderung des Abstandes zwischen Reaktionsgefäß und 500-Watt-Lampe variiert werden (vgl.S.17/18). Für zwei Meßserien mit jeweils konstanter Temperatur und konstanter Chloroplastenkonzentration zeigt Abb.12 die Meßwerte der Hill-Aktivität für verschiedene Beleuchtungsintensitäten. Bei gutem Umpumpen der Chloroplastensuspension wird Lichtsättigung in dem Bereich zwischen 30 000 und 50 000 Lux erreicht. Es wurde bei allen anderen Versuchen mit 70 000 Lux gearbeitet - also im Bereich der Lichtsättigung.

Nach Lumry and Spikes (1957) sowie Rieske, Lumry and Spikes (1959) kann der Zusammenhang zwischen Hill-Aktivität und Beleuchtungsintensität durch folgende experimentell ermittelte Formel wiedergegeben werden:

$$V = \frac{kI}{K + I} \qquad (a)$$

Darin ist V die Hill-Aktivität, I die Beleuchtungsintensität; die Bedeutung der Konstanten K und k wird bei der Betrachtung der Grenzfälle sehr kleiner und sehr großer Lichtintensität klar.

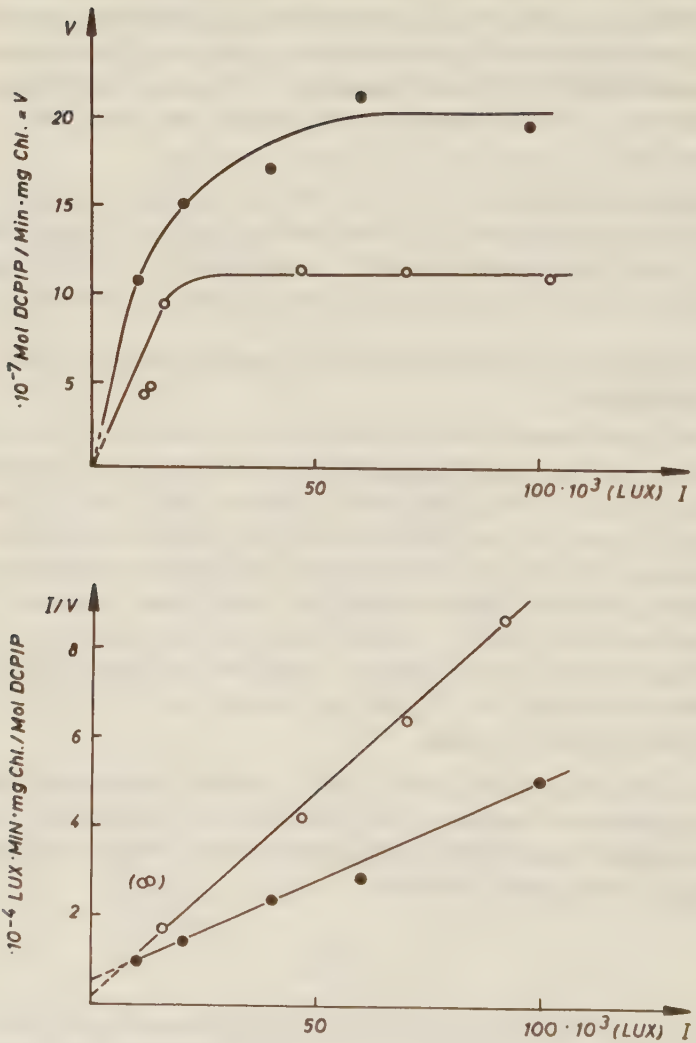


Abb.12: Oberes Diagramm: Abhängigkeit der Hill-Aktivität V von der Beleuchtungsintensität I;
unteres Diagramm: I/V ist gegen I aufgetragen, vergl. Gl.(b), S.38.
(Volle Kreise 23,5°C, leere Kreise 19,1°C)

Bei sehr kleiner Lichtintensität ($I \ll K$) ist $V \approx \frac{k}{K} \cdot I$, d.h. die Hill-Aktivität ist proportional der Lichtintensität. Bei sehr großer Lichtintensität, Lichtsättigung ($I \gg K$) ist V proportional k, d.h. der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist eine Dunkelreaktion.

Durch Umformung der Gleichung (a) erhält man

$$\frac{I}{V} = \frac{K}{k} + \frac{I}{k} \qquad \text{(b)}$$

Trägt man $\frac{I}{V}$ gegen I auf, so erhält man Geraden, wie Abb.12 zeigt. Die beiden Punkte bei 11 000 bzw. 13 000 Lux liegen nicht auf der Geraden. Da diese Aktivitäten 7 bzw. 8 Stunden nach Beginn der Chloroplastenisolierung gemessen wurden, muß man annehmen, daß die Aktivität des Chloroplastenmaterials schon abgenommen hatte. Diese beiden Punkte sind also aus der Meßserie auszuschließen.

c) Abhängigkeit der Hill-Aktivität von der Sauerstoffkonzentration

Es wurde die Hill-Aktivität in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt des durchgeleiteten Gases untersucht. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse zweier Versuchsserien. Innerhalb der Meßgenauigkeit von ± 5 % ist die Hill-Aktivität unabhängig von der Sauerstoffkonzentration des durchgeleiteten Gases.

Tabelle 1:

Serie A (23,2°C)		Serie B (29,0°C)	
% O_2	Hill-Aktivität	% O_2	Hill-Aktivität
0	$9{,}9 \cdot 10^{-7}$	21,0	$20{,}3 \cdot 10^{-7}$
4,4	10,3	64,7	19,0
8,2	10,1	72,1	19,6
21,0	9,4	85,4	19,0

Hill-Aktivität ist angegeben in Mol DCPIP/(mg Chlorophyll · Minute).

d) Abhängigkeit der Hill-Aktivität von der Temperatur

Abb.13 zeigt die Hill-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur. Es sind in dieses Diagramm 56 Meßpunkte eingezeichnet, die von 19 verschiedenen Präparationen in einem Zeitraum von 6 Monaten gemessen wurden. Es mußte auch bei dieser Arbeit festgestellt werden, daß die Aktivität von Präparation zu Präparation schwankt (vergl. Bishop 1955). Die Meßpunkte beschreiben eine Kurve, die man in zwei Teile zerlegen kann: Von ca. 10°C bis 33°C nimmt die Hill-Aktivität mit steigender Temperatur zu; bei Temperaturen über 34°C wird die Aktivitätszunahme zunehmend von einer irreversiblen thermischen Inaktivierung der Chloroplasten überlagert. Der Kurvenverlauf entspricht den Messungen von Bishop (1955).

In dem Bereich von 10 bis 33°C kann man aus der Steigung der Geraden den Q_{10}-Wert (den Faktor, um den die Aktivität bei 10 Grad Temperaturerhöhung zunimmt) des bei Lichtsättigung die Geschwindigkeit der Hill-Reaktion bestimmenden Reaktionsschrittes bestimmen: Zwischen 15°C und 25°C wurde der Q_{10}-Wert 1,75 gefunden; in derselben Größenordnung sind in der Literatur angegebene Q_{10}-Werte:

1,5	(20°C)	Baldry et al. 1966 (CO_2-Fixierung, Erbsen)
1,7	(5-35°C)	Holt et al. 1951 (Spinat, TCPIP)
1,9	(15/16°C)	Baldry et al. 1966 (CO_2-Fixierung, Erbsen)
2,0	(0-30°C)	Noddack et al. 1940 (O_2-Entwicklung, Chlorella) +)
2	(15-25°C)	Wassermann et al. 1968 (Ferricyanid, Spinat)
2,1	(10-20°C)	Warburg 1919 (O_2-Entwicklung, Chlorella) +)
2,1	(t 25°C)	Blackman 1904 (CO_2-Einbau, ganze Blätter)

(die mit +) bezeichneten Angaben sind der Arbeit von Baldry et al. (1966) entnommen).

Die Aktivierungsenergie der Hill-Reaktion kann aus dem linearen Teil der Temperaturkurve mit der Arrheniusschen Gleichung berechnet werden:

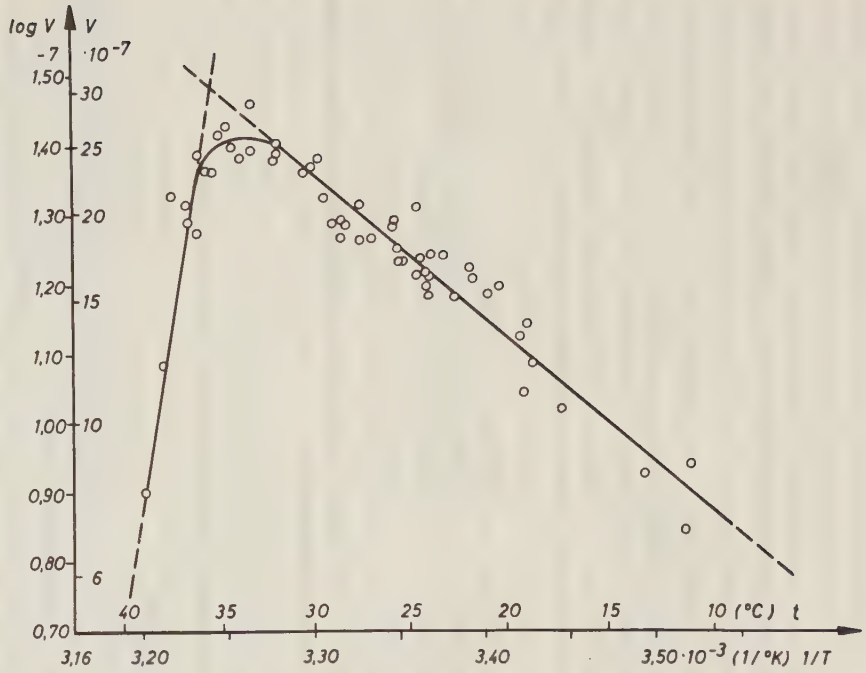


Abb.13: Abhängigkeit der Hill-Aktivität V von der Temperatur (21 % O_2, 70 000 Lux); V in Mol DCPIP/(mg Chl.·Min.).

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{A}{RT^2}$$

Eine Umformung ergibt

$$\frac{d \ln k}{d(1/T)} = - \frac{A}{R}$$

$$A = R \cdot 2{,}3 \cdot \frac{d \log k}{d(1/T)}$$

Als Aktivierungsenergie der Hill-Reaktion wurde gefunden 9,5 kcal/Mol.

Dieses Ergebnis stimmt recht gut mit anderen in der Literatur veröffentlichten Werten überein:

7,5 kcal/Mol,	Gilmour 1953 (Zuckerrübe) +)
8,0-9,5 kcal/Mol,	Wessels 1954 (Spinat)
8,5 kcal/Mol,	Spikes 1950 (Spinat) +)
9,4 kcal/Mol,	Fujimara 1953/54 +)
10 kcal/Mol,	Bishop et al. 1955 (Swiss chard)
11 kcal/Mol,	Rieske 1955 (Swiss chard) +)
13,0 kcal/Mol,	Rieske et al. 1959 (Swiss chard)

(die mit +) bezeichneten Angaben sind der Arbeit von Bishop et al. 1955 entnommen).

C. Kinetik der Reduktion von DCPIP

1. Einleitung

Die photochemische Reduktion von DCPIP durch Chloroplasten wird als analytische Methode zur Bestimmung der Hill-Aktivität von Chloroplasten benutzt. Es ist üblich, mit einer Anfangskonzentration c_o von ca. 10^{-4} Mol Farbstoff/l zu arbeiten und die Anfangssteigung $(\frac{dc}{dt})_{t=0}$ dividiert durch die Chloroplastenkonzentration als Maß für die Hill-Aktivität

anzusehen.
(u.a. Avron, Krogmann, Jagendorf 1958, Vernon and Shaw 1965, Anderson and Boardman 1966, Katoh 1967, West and Hill 1967).

Dieses Verfahren ist dann gerechtfertigt, wenn die Farbstoffreduktion eine Reaktion nullter Ordnung ist, d.h. $dc/dt = const.$. Verfolgt man die Reduktionsreaktion aber über einen größeren Konzentrationsbereich von DCPIP, so findet man fast immer erhebliche Abweichungen von einer Reaktion nullter Ordnung: Mit abnehmender Farbstoffkonzentration geht die Reaktion nullter Ordnung kontinuierlich in eine Reaktion erster Ordnung über. Um eine von der Anfangskonzentration an DCPIP, c_o, unabhängige Hill-Aktivität zu erhalten, muß man also in irgendeiner Weise auf höhere Farbstoffkonzentration extrapolieren. Die Begründung eines solchen Extrapolationsverfahrens ist Gegenstand dieses Kapitels.

Die Experimente, auf die sich die Diskussion in diesem Kapitel bezieht, waren alle von der gleichen Art - siehe Abb.14:

Eine Chloroplastensuspension (ca. 20 mg/l Chlorophyll) mit einer DCPIP-Ausgangskonzentration von ca. 10^{-4} Mol/l wurde so lange (3 - 8 Minuten) mit 70 000 Lux belichtet, bis ein stationärer Zustand erreicht war, in dem die DCPIP-Konzentration 1/10 bis 1/100 des Ausgangswertes betrug. Dann wurde das Licht ausgeschaltet und der langsame Wiederanstieg der Extinktion gemessen. Offensichtlich kommt der stationäre Zustand der Reduktion dadurch zustande, daß die Reduktion des Farbstoffs und die Rückoxidation des reduzierten Farbstoffs gerade gleich schnell verlaufen.

Folgende Erklärungsmöglichkeiten sind für die Abweichung der DCPIP-Reduktion von einer Reaktion nullter Ordnung zu erwägen:

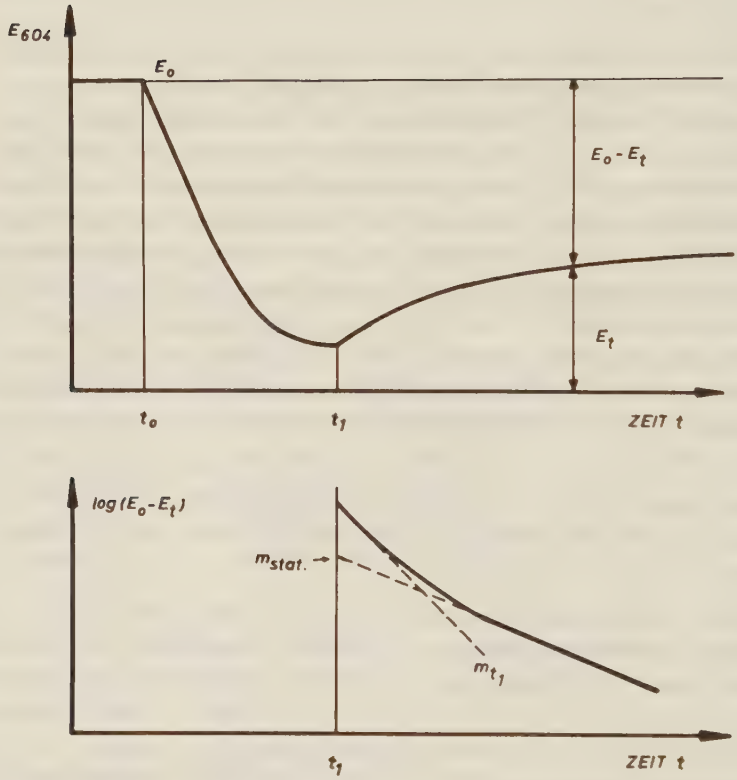


Abb.14: Schematischer Verlauf der Reduktion von DCPIP und der Rückoxidation von $DCPIPH_2$.

1. Die Rückoxidation des reduzierten Farbstoffs durch Sauerstoff, weil selbst beim Arbeiten unter Stickstoff mindestens eine dem reduzierten Farbstoff äquivalente Menge Sauerstoff produziert wird (für 1 $DCPIPH_2$ wird $\frac{1}{2}$ O_2 gebildet).

2. Die Tatsache, daß die DCPIP-Reduktion bei hohen Konzentrationen (c_o größer als 10^{-4} Mol/l) eine Reaktion nullter Ordnung ist, bedeutet, daß die Reduktion von DCPIP nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein kann. Mit abnehmender Farbstoffkonzentration muß aber irgendwann die Reduktion geschwindigkeitsbestimmend werden.

3. Prinzipiell muß man auch mit der Möglichkeit von Konkurrenzreaktionen, z.B. CO_2-Reduktion, rechnen, die sich aber erst bei kleinen Farbstoffkonzentrationen bemerkbar machen werden.

4. Durch die Arbeiten von Shen et al. (1963) und Gromet-Elhanan und Avron (1963 und 1964) wurde bewiesen, daß DCPIP bei Konzentrationen gleich oder größer als 10^{-4} Mol/l als Entkoppler der ATP-Bildung wirkt. In dem Konzentrationsbereich zwischen 10^{-4} Mol/l und $2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l DCPIP findet gerade der Übergang statt von keiner ATP-Bildung zu einer der Reduktion von DCPIP äquimolaren ATP-Bildung (Δ ATP / Δ FH_2 = 1). Die allmähliche Aufhebung der Entkopplerwirkung von DCPIP durch die Abnahme der Konzentration an DCPIP kann zu einer Verlangsamung der Reduktionsreaktion führen, besonders dann, wenn ADP und anorganisches Phosphat in unzureichender Menge vorhanden sind (Gromet-Elhanan et al. 1963).

5. Die Aktivität der Chloroplasten könnte während der Belichtung merklich abnehmen. Die Versuche auf Seite 33 (Abb.10) zeigen, daß bei relativ kurzen Belichtungszeiten von 3 bis 6 Minuten die Annahme ungefähr konstanter Aktivität gerechtfertigt ist.

Bei der kinetischen Analyse der Reduktionskurven wurden nur die Möglichkeiten 1. - 3. berücksichtigt. Um die Übersicht zu erleichtern, wird zunächst der Gang der kinetischen Analyse skizziert, bevor alle Ableitungen im einzelnen gebracht werden.

Das Ziel der kinetischen Analyse war:

1. die Entwicklung eines Verfahrens für eine Sauerstoffkorrektur der Reduktionskurven;
2. die Berechnung eines konzentrationsunabhängigen Wertes der Hill-Aktivität durch Extrapolation auf hohe Farbstoffkonzentration.

2. Sauerstoffkorrektur der Reduktionskurven

Der Ausgangspunkt für die Sauerstoffkorrektur der DCPIP-Reduktionskurven waren folgende Hypothesen:

1. Der Reduktion des Farbstoffs ist eine Rückoxidation des reduzierten Farbstoffs durch Sauerstoff überlagert, die mit zunehmender Konzentration an reduziertem Farbstoff immer stärker ins Gewicht fällt und schließlich zu einem stationären Zustand mit konstanter Farbstoffkonzentration führt.
2. Die Geschwindigkeit der Rückoxidation läßt sich aus dem Wiederanstieg der Extinktion nach dem Abschalten des Lichts berechnen. Die Geschwindigkeit der Rückoxidation ist der Konzentration des reduzierten Farbstoffs und der Konzentration des gelösten Sauerstoffs proportional. -

Die einzelnen Schritte bei der Entwicklung des Sauerstoffkorrekturverfahrens seien kurz skizziert:

a) Aus der Rückoxidationskurve werden gewonnen: eine Geschwindigkeitskonstante k_r für die Rückoxidation, die Sauerstoffkonzentration x_1 beim Abschalten und eine Konstante, k_s, die angibt, mit welcher Geschwindigkeit sich

die Gleichgewichtskonzentration des gelösten Sauerstoffs einstellt.

b) Aus den Werten x_1, k_r und k_s wird berechnet, mit welcher Mindestgeschwindigkeit zu Beginn der Belichtung Sauerstoff produziert wird.

c) Der Vergleich des für die Sauerstoffbildungsgeschwindigkeit berechneten Wertes mit der Farbstoffreduktionsgeschwindigkeit zeigt, daß die berechnete Sauerstoffproduktion viel zu hoch ist. x_1 bedeutet deshalb nicht eine Sauerstoffkonzentration, sondern ist nur ein Maß für das Oxidationsvermögen des Mediums.

d) Die "Oxidationskraft" des Mediums wird zwischen den Werten x_o beim Einschalten und x_1 beim Ausschalten des Lichts linear interpoliert.

e) Ein Verfahren für die Sauerstoffkorrektur der Reduktionskurven wird begründet.

2.1. Die Sauerstoffkonzentration als Funktion der Zeit nach dem Abschalten des Lichts

Nach dem Abschalten des Lichts steigt die Extinktion bei 604 nm wieder an; der reduzierte Farbstoff wird rückoxidiert. Die Geschwindigkeit der Rückoxidation ist sicher der Konzentration an reduziertem Farbstoff proportional. Macht man darüber hinaus die Annahme, daß die Rückoxidation nur von der Konzentration an gelöstem Sauerstoff abhängt und zu ihr proportional ist, dann gilt

$$\frac{dc}{dt} = k_r' \cdot x \cdot (c_o - c) \qquad (1)$$

([DCPIP] $\equiv c$; [DCPIPH$_2$] $\equiv c_o - c$; [O_2] $= x$; k_r' = Rückoxidationskonstante).
Umformung von (1) gibt

$$-\frac{d \ln(c_o - c)}{dt} = k_r' \cdot x \qquad (2)$$

Bei konstanter Sauerstoffkonzentration sollte also $\ln(c_o - c)$ gegen t aufgetragen eine Gerade ergeben.

In Abb.15 ist die Rückoxidation für verschiedene Sauerstoffkonzentrationen des durchgeleiteten Gases als Funktion von der Zeit nach dem Abschalten des Lichts aufgetragen. Abb.15 zeigt, daß die Rückoxidationsgeschwindigkeit nicht konstant ist, vielmehr daß die Rückoxidation unmittelbar nach dem Abschalten des Lichts schneller abläuft und erst allmählich einen konstanten Wert annimmt. Es lag nahe, die Abweichung von der Linearität folgendermaßen zu erklären:

Während der Reduktion hat die Konzentration an gelöstem Sauerstoff durch die zur Reduktion von DCPIP parallel verlaufende Sauerstoffproduktion zugenommen. Nach dem Abschalten des Lichts erreicht die Sauerstoffkonzentration erst allmählich wieder ihren dem Sauerstoffgehalt des durchgeleiteten Gases entsprechenden Gleichgewichtswert.

Das würde bedeuten, daß wie in a) angenommen, die Steigung von $\ln(E_o - E) = f(t)$ der jeweiligen Sauerstoffkonzentration proportional ist.

Die Richtigkeit dieser Annahme schien sich einmal durch Experimente mit hohen Sauerstoffkonzentrationen des durchgeleiteten Gases bestätigen zu lassen. Die Abweichungen von $\ln(E_o - E) = f(t)$ von einer Geraden werden mit zunehmender Sauerstoffkonzentration des durchgeleiteten Gases kleiner, weil die relative Zunahme der Sauerstoffkonzentration beim Belichten kleiner ist (siehe Abb.15 $\ln(E_o - E) = f(t)$). Zum anderen zeigt sich die Richtigkeit der Annahme a) folgendermaßen: Wie in Abb.15 wurde für verschiedene Sauerstoffpartialdrucke des durchgeleiteten Gases die Rückoxidation so lange gemessen, bis die Steigung von $\ln(c_o - c) = f(t)$ konstant ist. Diese Endsteigungen als Funktion vom Sauerstoffgehalt aufgetragen (Abb.16) zeigen in befriedigender Weise, daß der Endwert der Rückoxidation der Gleichgewichtskonzentration

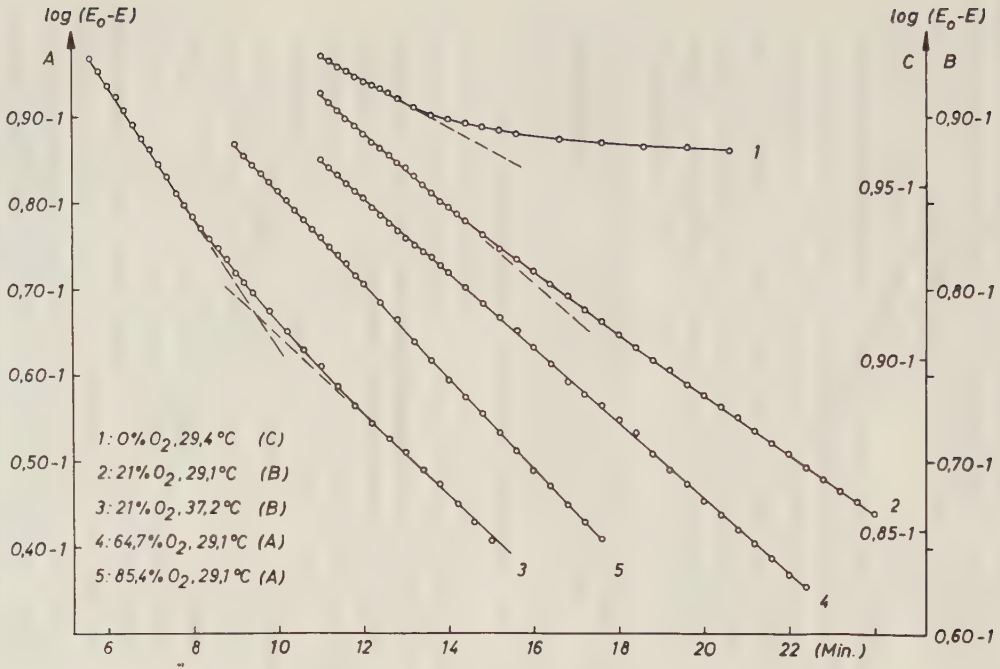


Abb.15: Rückoxidation von $DCPIPH_2$ als Funktion der Zeit nach dem Ausschalten des Lichts. Die Kurven sind in der Abszisse gegeneinander verschoben. Der erste Punkt wurde jeweils gleich nach dem Ausschalten des Lichts gemessen.

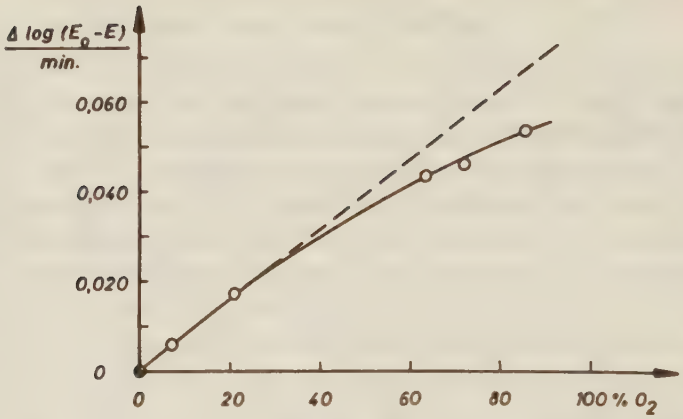


Abb.16: Rückoxidationsgeschwindigkeit von $DCPIPH_2$ in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration des durchgeleiteten Gases (29,2°C).

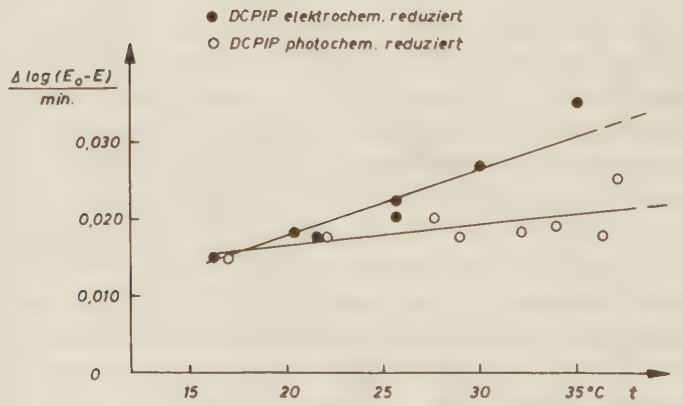


Abb.17: Rückoxidationsgeschwindigkeit von elektrochemisch, bzw. photochemisch (durch Chloroplasten) reduziertem DCPIP in Abhängigkeit von der Temperatur (21 % O_2).

an gelöstem Sauerstoff, also auch dem Sauerstoffpartialdruck des durchgeleiteten Gases proportional ist. Die Abweichungen in Abb.16 vom geradlinigen Verlauf der Rückoxidationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration des durchgeleiteten Gases können verschiedene Ursachen haben:

a) Ein systematischer Fehler könnte bei der Zusammensetzung des durchgeleiteten Gases vorliegen. Sauerstoffgehalte kleiner als 21 % O_2 wurden durch Mischen von Preßluft und Stickstoff, Sauerstoffgehalte größer als 21 % wurden durch Mischen von Preßluft und reinem Sauerstoff hergestellt. Es wäre z.B. denkbar, daß der Sauerstoff nicht 100 %ig war.

b) Luftdruckschwankungen können Abweichungen bis zu ± 3 % erklären.

c) Es wurde zum Vergleich die Oxidation von elektrolytisch (s.S.18) reduziertem Farbstoff gemessen. Bei 15°C war die Sauerstoffabhängigkeit die gleiche wie bei der Rückoxidation des photochemisch durch Chloroplasten reduzierten Farbstoffs; bei höheren Temperaturen wurde der elektrolytisch reduzierte Farbstoff jedoch schneller oxidiert (siehe Abb.17, S.49). Die Ursache dafür kann die Bildung von katalytisch wirkenden Produkten bei der elektrochemischen Reduktion, das Vorhandensein von oxidationshemmenden Stoffen in der Chloroplastensuspension oder beides sein.

Wie man aus Abb.15 (Rückoxidation = f(Zeit nach Abschalten des Lichts)) entnehmen kann, ist die Sauerstoffkonzentration beim Abschalten des Lichts höher als der dem Sauerstoff-Partialdruck des durchgeleiteten Gases entsprechende Wert. Es kann angenommen werden, daß die Geschwindigkeit, mit der sich die Gleichgewichtskonzentration von Sauerstoff wieder einstellt, proportional zur Differenz zwischen der augen-

blicklichen Sauerstoffkonzentration und der Sauerstoffkonzentration im Gleichgewicht ist; d.h.

mit $[O_2] \equiv x$ (zur Zeit t)
$[O_2]_{Gl.} \equiv x_o$ = Gleichgewichtswert, stationärer Wert
$x_1 \equiv [O_2]$ beim Abschalten des Lichts

ergibt sich

$$\frac{dx}{dt} = - k_s \cdot (x - x_o) \qquad (3)$$

k_s ist eine von der Umpumpgeschwindigkeit der Suspension, der Durchleitgeschwindigkeit des Gasgemisches und von geometrischen Faktoren abhängige Konstante.

Neben der direkten Entfernung des Sauerstoffs aus der Lösung ist an sich auch der Verbrauch von Sauerstoff bei der Rückoxidation zu berücksichtigen. Es läßt sich aber abschätzen, daß dieser Verbrauch von Sauerstoff um eine Größenordnung kleiner ist und deshalb vernachlässigt werden kann.

Integration von (3) $\frac{dx}{(x-x_o)} = - k_s \, dt$ ergibt

$$\ln \left(\frac{x - x_o}{x_1 - x_o}\right) = - k_s \cdot (t - t_1)$$

$$\boxed{x = x_o + (x_1 - x_o) \cdot \exp \left[- k_s (t - t_1) \right]} \qquad (4)$$

Gleichung (4) gibt die Sauerstoffkonzentration als Funktion von der Zeit nach dem Abschalten an. Setzt man nun den Wert von x nach Gleichung (4) in Gleichung (2) ein, so erhält man:

$$\frac{d \ln (c_o - c)}{dt} = - k_r' \cdot \left[x_o + (x_1 - x_o) \cdot \exp \left[- k_s (t - t_1) \right] \right] \qquad (5)$$

Integration von (5) in den Grenzen t_1 bis t ergibt:

$$\ln \frac{c_o - c}{c_o - c_1} = - k_r' \cdot \left[x_o (t - t_1) + \frac{x_1 - x_o}{k_s} \cdot (1 - e^{-k_s (t - t_1)}) \right] \qquad (6)$$

Mit der Vereinfachung

$$k_r' \, x = m = - \left(\frac{d \ln (c_o - c)}{dt} \right) \qquad (7)$$

folgt aus (6)

$$\boxed{\ln \frac{c_o - c}{c_o - c_1} = - m_o \cdot (t - t_1) - \frac{m_1 - m_o}{k_s} \cdot (1 - e^{-k_s (t - t_1)})} \qquad (8)$$

Die drei Konstanten m_o, m_1 und k_s lassen sich wie folgt bestimmen:

m_1 und m_o sind die Anfangs- und Endsteigung von $\ln(c_o - c) = f(t)$.

Ist $k_s (t - t_1)$ sehr viel größer als 1, so ist $e^{-k_s (t - t_1)}$ gegen 1 zu vernachlässigen, und es gilt

$$\frac{1}{k_s} = - \frac{1}{m_1 - m_o} \cdot \left[\ln \frac{c_o - c}{c_o - c_1} + m_o \cdot (t - t_1) \right] \qquad (9)$$

Da die Extinktion proportional zur Konzentration c ist, gilt Gleichung (8) auch für Extinktionen.

Die drei Konstanten der Gleichung (8) m_1, m_o und k_s wurden mit Hilfe eines Computers[+)] berechnet. Als zu approximierende

[+)] Für die Programmierung und Berechnung einiger Kurven möchte ich an dieser Stelle meinem Mann, Dr.B.Nickel, danken.

Kurve wurde nicht $\ln(E_o - E)$ zugrunde gelegt, sondern direkt $E_o - E = f(t)$. Da die Meßgenauigkeit von E in dem Bereich von E = 1,0 bis E = 0 konstant ist, hat das den Vorteil, daß der absolute Fehler von E unabhängig von E ist für E kleiner als 1,0.

Gleichung (8) nach $c_o - c$, bzw. $E_o - E$ aufgelöst gibt:

$$E_o - E = (E_o - E_1) \cdot \exp\left[- m_o(t-t_1) - \frac{m_1 - m_o}{k_s} \cdot (1 - e^{-k_s(t-t_1)})\right]$$

$$= y(t) \qquad (10)$$

y_i (i = 1,2,3,...N) seien die Meßwerte zu den Zeiten t_i. Das Approximationskriterium war, daß die Summe der Fehlerquadrate möglichst klein sein sollte;

$$\sum_{i=1}^{N} \left[y(t_i) - y_i\right]^2 = \text{Minimum} \qquad (11)$$

worin $y(t_i)$ der mit den drei Konstanten berechnete y-Wert und y_i der in der Rückoxidation gemessene Wert ist. Die Güte der Approximation wird durch die Standardabweichung S wiedergegeben.

$$S = \sqrt{\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^{N} \left[y(t_i) - y_i\right]^2}$$

Die Rückoxidationskurven ließen sich sehr befriedigend durch (10) wiedergeben. Die Standardabweichungen lagen für verschiedene Kurven zwischen 0,001 und 0,004; d.h. sie lagen im Bereich der Meßgenauigkeit der Extinktion(±0,003).

Als Beispiele seien eine besonders gute und eine besonders schlechte Approximation von Rückoxidationskurven angegeben (Abb.18a-c).

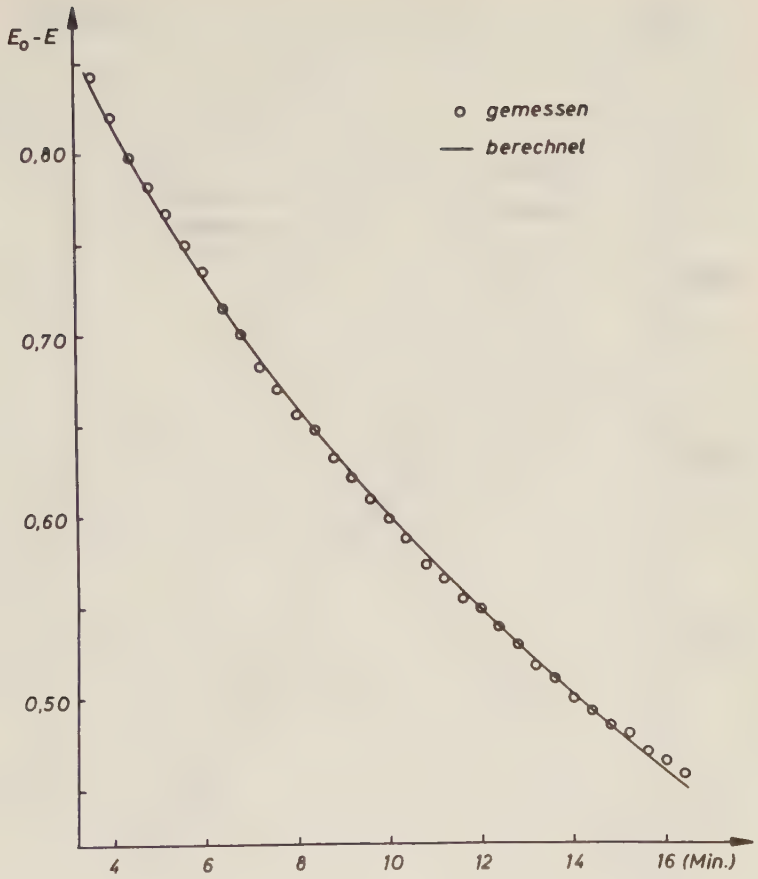


Abb.18a: Rückoxidation von DCPIPH$_2$. Die ausgezogene Kurve wurde nach Gl.(10) berechnet. Die Konstanten m_o, m_1, k_s in Gl.(10) wurden nach dem auf S.53 beschriebenen Approximationsverfahren berechnet.
Versuch I (Tabelle 2): 27,7°C, 21 % O_2, Standardabweichung der Meßpunkte von der berechneten Kurve 0,0035.

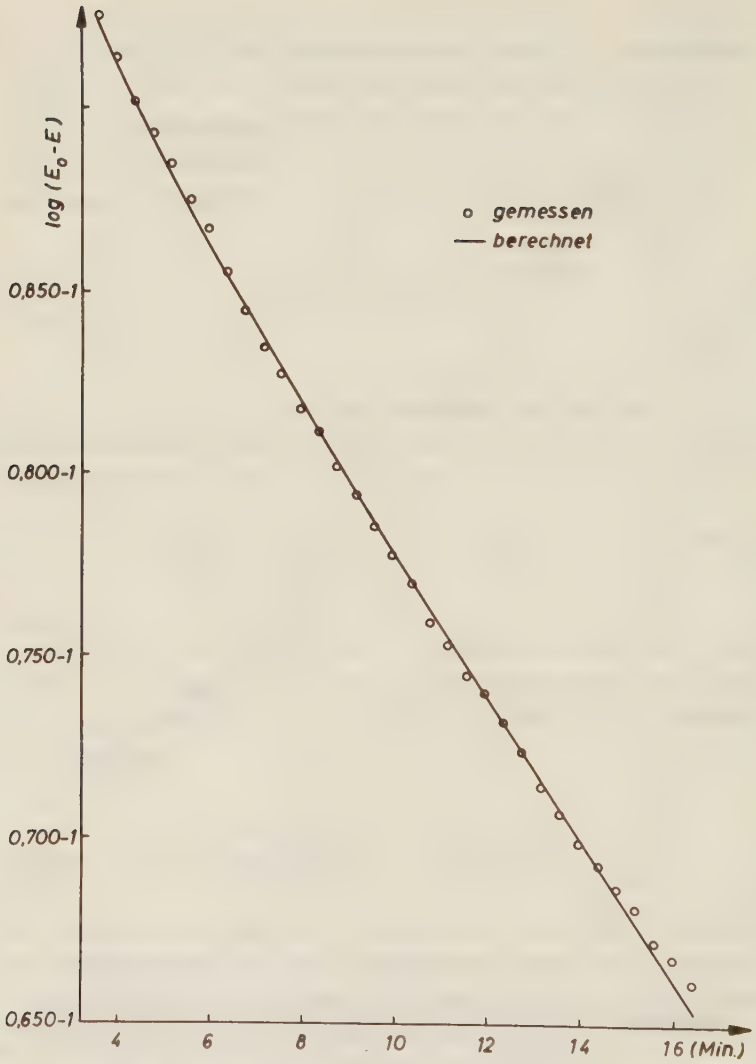


Abb.18b: Rückoxidation von DCPIPH$_2$. Die Daten von Abb.18a sind logarithmisch aufgetragen.

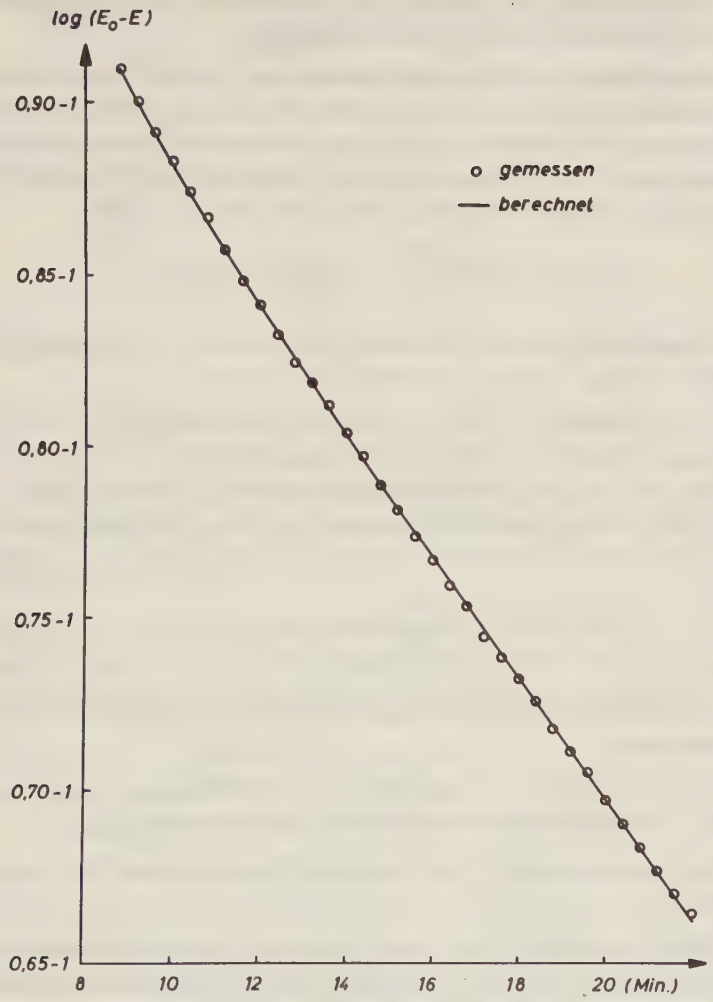


Abb.18c: Rückoxidation von DCPIPH$_2$.
Versuch II (Tabelle 2): 29,0°C, 21 % O_2.
Vergl. Legende zu Abb.18a. Die Standardabweichung der Meßpunkte E_0-E von den berechneten Werten ist 0,0012.

2.2. Abschätzung der während der Reduktion von DCPIP mindestens gebildeten Sauerstoffmenge

Die Auswertung der Rückoxidationskurven liefert nur relative Sauerstoffkonzentrationen. Für absolute Angaben muß die Löslichkeit von Sauerstoff in dem verwendeten Puffergemisch bekannt sein. Die Konzentration x_o des gelösten Sauerstoffs wurde nach folgender Formel berechnet (siehe S.20):

$$x_o = 8{,}9 \cdot 10^{-4} \cdot f \cdot \frac{P}{100} \quad [\text{Mol/l}] \qquad (12)$$

(P = Sauerstoffgehalt des Gases in Prozent; f = Temperaturfaktor - vergl. Abb.5; bei 25°C ist f = 1).

Die Rückoxidation, also die Steigung m von $\ln(c_o - c) = f(t)$, sei proportional der Sauerstoffkonzentration x. m_o entspricht der Gleichgewichtskonzentration x_o. Entsprechend gilt für die Sauerstoffkonzentration beim Abschalten des Lichts x_1:

$$x_1 = x_o \cdot \frac{m_1}{m_o} \; ; \quad x_1 > x_o \qquad (13)$$

Für die Sauerstoffentwicklung während der Belichtung kann man annehmen:

a) Die Geschwindigkeit der Sauerstoffentwicklung nimmt ab und ist der Farbstoffentfärbung äquivalent; oder

b) Die Geschwindigkeit der Sauerstoffentwicklung ist konstant.

Will man, ausgehend von einer bekannten Sauerstoffkonzentration beim Ausschalten des Lichts, auf die minimal während der Belichtung gebildete Sauerstoffmenge schließen, so muß man von b) ausgehen. Man kann sich das leicht mit Hilfe von Abb.19 klarmachen.

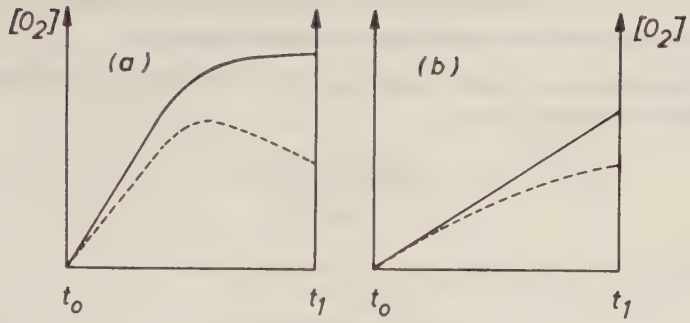


Abbildung 19a: Abbildung 19b:

——— O_2-Produktion

----- O_2-Konzentration

Die Sauerstoffkonzentration bei t_1 ist in beiden Fällen gleich; die produzierte Sauerstoffmenge ist aber in (a) größer als in (b).

Der Sauerstoff werde mit konstanter Geschwindigkeit k_o produziert und mit der Geschwindigkeit k_s durch das durchgeleitete Gasgemisch aus der Suspension entfernt. Dann gilt

$$\frac{dx}{dt} = k_o - k_s \cdot (x - x_o) \tag{14}$$

$$\int_{x_o}^{x} \frac{dx}{x - x_o - k_o/k_s} = - k_s \int_{o}^{t} dt \tag{15}$$

$$\ln \frac{x - x_o - k_o/k_s}{- k_o/k_s} = - k_s \cdot t \tag{16}$$

Auflösen von Gleichung (16) nach x gibt

$$x = x_o + \frac{k_o}{k_s} \cdot (1 - e^{-k_s \cdot t}) \tag{17}$$

Gleichung (17) beschreibt die Sauerstoffkonzentration während der Reduktion unter der Voraussetzung (b).

Die Konstante k_o erhält man aus (17) für den Zeitpunkt des Lichtabschaltens $t = t_1$:

$$k_o = \frac{k_s \cdot (x_1 - x_o)}{1 - e^{-k_s t_1}} \qquad (18)$$

oder, da x_1/x_o gleich m_1/m_o ist (13),

$$k_o = \frac{k_s \cdot x_o \cdot (m_1/m_o - 1)}{1 - e^{-k_s t_1}} \qquad (19)$$

Der Wert k_o stellt einen unteren Grenzwert dar für die Sauerstoffproduktionsgeschwindigkeit beim Einschalten des Lichts ($t=t_o$). k_o-Werte für verschiedene Versuche siehe Tabelle 2 (s.S.60). Wären bei t_o, beim Einschalten des Lichts, Farbstoffreduktion und Sauerstoffproduktion äquivalent, dann müßte gelten

$$k_o = -\frac{1}{2}\left(\frac{dc}{dt}\right)_{t=t_o} \qquad (20)$$

Tatsächlich wurde aber in fast allen durchgerechneten Beispielen (siehe Tabelle 2, letzte Spalte) gefunden

$$k_o = g \cdot \frac{1}{2} \cdot \left(\frac{dc}{dt}\right)_{t=t_o} ; \quad 1 \leq g \leq 2{,}5 \qquad (21)$$

Die berechnete produzierte Sauerstoffmenge war 4 bis 5 mal größer als der Menge an reduziertem Farbstoff entsprechen würde. Wie ist dieses Ergebnis zu interpretieren?

Tabelle 2:

Nr.	t °C	% O_2	O_2 stat. Mol/l	Chl. mg/l	E_o	t_1 Min.	$-(\frac{dc}{dt})_{t=0}$ +) Mol/Min.	$2{,}3 \cdot m_1$ $Min.^{-1}$	$2{,}3 \cdot m_o$ $Min.^{-1}$	k_s $Min.^{-1}$	k_o Mol/l·Min.	$\frac{2\,k_o}{(\frac{dc}{dt})_{t=0}}$
I.	27,7	21	$1{,}78 \cdot 10^{-4}$	20,0	0,865	4,0	$0{,}415 \cdot 10^{-4}$	0,0625	0,0443	0,337	$3{,}56 \cdot 10^{-5}$	1,72
II.	29,0	21	$1{,}70 \cdot 10^{-4}$	14,3	0,845	8,4	$0{,}295 \cdot 10^{-4}$	0,0547	0,0397	0,261	$1{,}88 \cdot 10^{-5}$	1,27
III.	32,2	21	$1{,}65 \cdot 10^{-4}$	16,4	0,890	4,2	$0{,}417 \cdot 10^{-4}$	0,0741	0,0411	0,267	$5{,}45 \cdot 10^{-5}$	2,62
IV.	37,2	21	$1{,}53 \cdot 10^{-4}$	18,4	0,875	4,2	$0{,}380 \cdot 10^{-4}$	0,1034	0,0573	0,357	$5{,}80 \cdot 10^{-5}$	3,05
V.	29,4	7,2	$0{,}58 \cdot 10^{-4}$	20,5	1,030	8,0	$0{,}278 \cdot 10^{-4}$	0,0534	0,0141	0,183	$3{,}83 \cdot 10^{-5}$	2,75
VI.	29,5	10,7	$0{,}88 \cdot 10^{-4}$	20,6	0,940	10,1	$0{,}250 \cdot 10^{-4}$	0,0484	0,0335	0,284	$1{,}18 \cdot 10^{-5}$	0,94
VII.	29,4	0 [1]	0	19,2	0,990	6,7	$0{,}293 \cdot 10^{-4}$	0,0291	$0{,}0000_1$	$0{,}049_5$	$1{,}84 \cdot 10^{-5}$	1,26
VIII.	29,4	0 [2]	0	20,4	0,975	7,4	$0{,}281 \cdot 10^{-4}$	-	$0{,}0000_1$			

1) N_2 über die Suspension geleitet

2) N_2 durch die Suspension geleitet

O_2 stat. = Gleichgewichtskonzentration des gelösten Sauerstoffs

Chl. = Chlorophyllkonzentration

t_1 = Belichtungszeit

+) graphisch bestimmte Anfangssteigung

m_1 = Anfangssteigung von $\log(E_o - E) = f(t)$

m_o = Endsteigung von $\log(E_o - E) = f(t)$

k_s = Geschwindigkeit, mit der sich die Gleichgewichtskonzentration des gelösten Sauerstoffs einstellt (vergl.Gl.8)

k_o = nach Gleichung (19) berechnete minimale Geschwindigkeit der Sauerstoff-Produktion

Der bisherigen Diskussion der Rückoxidationskurven lagen drei Annahmen zugrunde:

1) Die Rückoxidation ist proportional der Konzentration an gelöstem Sauerstoff x,

$$\frac{dc}{dt} = k_r' \cdot x \cdot (c_o - c) \qquad (1)$$

mit anderen Worten: Die Steigung von $\ln(c_o - c) = f(t)$ ist der jeweiligen Sauerstoffkonzentration proportional.

2) Wenn die Steigung der Rückoxidation konstant geworden ist, dann entspricht sie der Gleichgewichtskonzentration des gelösten Sauerstoffs.

3) Die Anfangssteigung der Rückoxidation beim Ausschalten des Lichts (t_1) ist m_1; sie gibt an, wieviel größer die Sauerstoffkonzentration bei t_1 ist gegenüber dem stationären Wert m_o.

Alle drei Annahmen führten

a) zu einem Wert der Sauerstoffkonzentration bei t_1, beim Ausschalten, und

b) mit der Annahme konstanter Sauerstoffproduktion zu einem Wert k_o [Mol O_2/l·Min.] bei t = 0, beim Beginn der Reduktion. Obwohl dieser Wert nur eine untere Grenze der Sauerstoffproduktion darstellt, war er bereits i.a. doppelt so groß wie nach der Farbstoffreduktion zu erwarten war.

Nun bestand die Hoffnung, diese Diskrepanz ließe sich dadurch erklären, daß die Anfangssteigung der Reduktionskurve nicht der wahren Hill-Aktivität entspricht, sondern infolge einer Nebenreaktion um den Faktor ca. zwei zu klein ist.

Die wahre Hill-Aktivität läßt sich aus der für Sauerstoff korrigierten Reduktionskurve berechnen, wie in Abschnitt C.3. dargelegt wird. Es zeigte sich, daß die wahre Hill-Aktivität k_m nur unwesentlich (0 - 30 %) größer ist als die Anfangs-

steigung der Reduktionskurve angibt.

Dieses Ergebnis zwingt dazu, die Deutung der Rückoxidationskurve zu revidieren. Von den Annahmen 1) bis 3) ist nur die Annahme 2) zu halten, daß die Endsteigung von $\ln(c_o-c) = f(t)$, m_o, proportional der Konzentration an gelöstem Sauerstoff ist. Die beim Abschalten des Lichts, t_1, zunächst größere Rückoxidationsgeschwindigkeit ist auf zwei Effekte zurückzuführen:

α) Wie bisher auf den Abtransport des gelösten Sauerstoffs durch das durchgeleitete Gas; aber das kann nicht das Ausmaß der Rückoxidation erklären; deshalb ß).

ß) Daneben auf das Vorhandensein eines weiteren oxidierenden Stoffes - neben O_2 - , der aber nur in begrenzter Menge vorhanden ist.

Es ist an sich erstaunlich, daß sich die Rückoxidationskurven z.T. sehr gut durch die Gleichung (10) $E_o - E = y(t)$ wiedergeben lassen, obwohl die Annahmen, die in Gleichung (2) stecken, sicher z.T. falsch sind. Das läßt sich folgendermaßen verstehen: Ist bei t_1 (Abschalten des Lichts) eine im Verhältnis zur gesamten Farbstoffkonzentration c_o kleine Menge eines Oxidationsmittels vorhanden, das aber wesentlich stärker oxidierend als Sauerstoff wirkt, dann ist dieses Oxidationsmittel vollständig verbraucht, bevor sich die Konzentration an reduziertem Farbstoff wesentlich geändert hat; d.h. dieses nicht bekannte Oxidationsmittel wird praktisch in einer Reaktion erster Ordnung verbraucht; diese Oxidation des reduzierten Farbstoffs ist der Oxidation durch Sauerstoff überlagert. - Nur aus der Rückoxidationskurve für 10,7 % O_2 berechnet man mit dem Approximationsverfahren eine viel zu große Endsteigung. Das ließe sich dadurch erklären, daß sich in diesem Fall bei der langen Belichtung größere Mengen des Oxidationsmittels gebildet haben können, so daß selbst bei den letzten Meßpunkten die Rückoxidation durch Sauerstoff noch nicht überwog.

Diese Neuinterpretation der Nichtlinearität von $\ln(c_o-c) = f(t)$ nach dem Abschalten des Lichts wirft zwei neue Fragen auf:

1) Welcher Natur ist dieses Oxidationsmittel? Kommt zu einem geringen Maße die Mehler-Reaktion als Konkurrenzreaktion zur Farbstoffentfärbung in Frage, bei der der Sauerstoff Akzeptor bei der Hill-Reaktion ist:

$$ZH_2 + O_2 \longrightarrow Z + H_2O_2$$
$$H_2O_2 + FH_2 \longrightarrow 2\,H_2O + F.$$

2) Welches Korrekturverfahren für die Reduktionskurven ist am zweckmäßigsten? Nimmt man an, daß die stationäre Endsteigung von $\ln(c_o-c) = f(t)$ allein der Rückoxidation durch Sauerstoff entspricht, dann gilt dieser Wert auch beim Einschalten des Lichts zu Beginn der Reduktion. Zwischen diesem Rückoxidationswert beim Einschalten (m_o) und dem Rückoxidationswert beim Ausschalten des Lichts (m_1) muß in irgendeiner Weise interpoliert werden.

2.3. Korrektur der Reduktionskurven

Prinzipiell ist es möglich, die Reduktion des Farbstoffes und die gleichzeitige Rückoxidation des reduzierten Farbstoffs geschlossen zu behandeln. Im Falle sehr einfacher Gesetzmäßigkeiten, z.B., wenn die Reduktion im ganzen Meßbereich eine Reaktion nullter Ordnung und die Sauerstoffkonzentration x_o konstant wäre, wäre dieses Verfahren auch vorzuziehen.

Da diese sehr einfachen Gesetzmäßigkeiten nicht vorliegen, wurde ein anderes Verfahren bevorzugt.

Der Reduktion von DCPIP ist eine gleichzeitige Rückoxidation des reduzierten Farbstoffs überlagert. Für die Rückoxidation gelte

$$\frac{dc}{dt} = k_r \cdot x \cdot (c_o - c) \qquad (1)$$

worin $c_o - c \equiv [DCPIPH_2]$, Konzentration an reduziertem Farbstoff, $x = [O_2]$ nach Gleichung (17); dabei hat x (vgl. während der Reduktion nur beim Einschalten des Lichts die Bedeutung einer Sauerstoffkonzentration; anschließend ist x als Maß für die Oxidationswirkung des Mediums aufzufassen.

Das Korrekturverfahren geht aus Abb.20 hervor.

Es gilt

$$(\frac{dc}{dt})_{exp.} = (\frac{dc}{dt})_{theoret.} + (\frac{dc}{dt})_{korr.} \qquad (22)$$

$$(\frac{\Delta c}{\Delta t})_{theor.} = (\frac{\Delta c}{\Delta t})_{exp.} - k_r \cdot \bar{x} \cdot (c_o - \bar{c}) \qquad (23)$$

$$(\frac{\Delta c}{\Delta t})_{theor.} = \frac{c_{j+1} - c_j}{t_{j+1} - t_j} - k_r \cdot \bar{x} \cdot (c_o - \bar{c}) \qquad (24)$$

Dabei wurde $\bar{x}$ gesetzt als x bei $(t_{j+1} + t_j)/2$ und folgendermaßen berechnet (lineare Interpolation zwischen x_o und x_1):

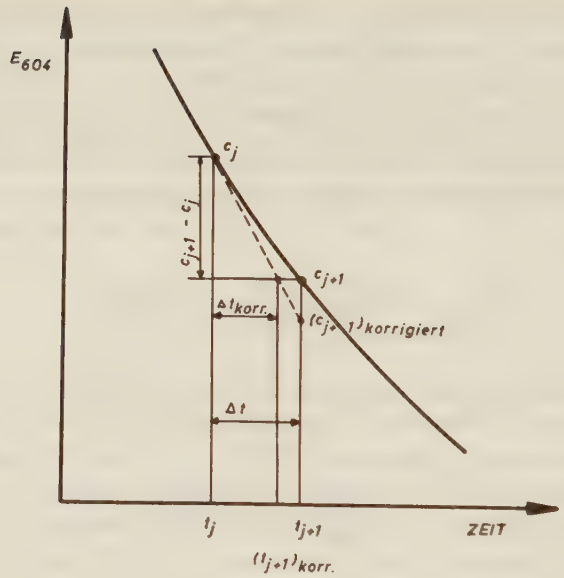
$$\bar{x} = x_o + \frac{x_1 - x_o}{t_1 - t_o} \cdot (t_{j+1} + t_j)/2 \qquad (25)$$

$\bar{c}$ wurde gesetzt als $(c_{j+1} + c_j)/2$.

Die Meßpunkte c_j, t_j wurden mit konstanten Zeitintervallen ($\Delta t = t_{j+1} - t_j$) abgelesen. Es war zweckmäßig, die Werte c_j unverändert zu lassen und die Zeiten t_j zu korrigieren. Es sei t_j' die korrigierte Zeit des Meßpunktes t_j, c_j, wobei t_j' kleiner als t_j ist.

Da aber $t_{j+1}' = t_j' + (\Delta t)_{korr.}$ und

$$\frac{c_{j+1} - c_j}{(\Delta t)_{korr.}} \equiv (\frac{dc}{dt})_{theoret.},$$



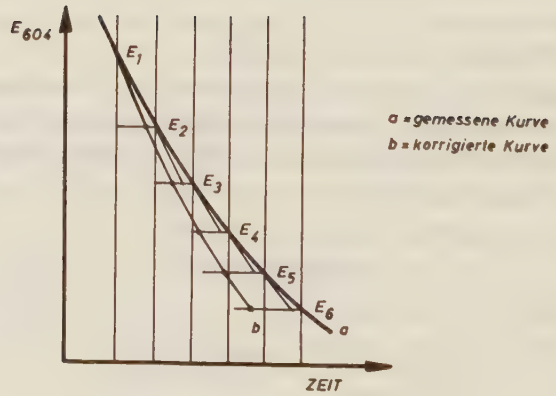


Abb.20: Rückoxidationskorrektur der Reduktionskurve, siehe S.64.

gilt für t_{j+1}', wie man sich auch an Abb.20 klarmachen kann:

$$t_{j+1}' = t_j' + \frac{1}{(\Delta c/\Delta t)_{theoret.}} \cdot (c_{j+1} - c_j) \qquad (26)$$

Abb.21a-c zeigen einige nach diesen Verfahren korrigierte Kurven (mit einem Computer berechnet).

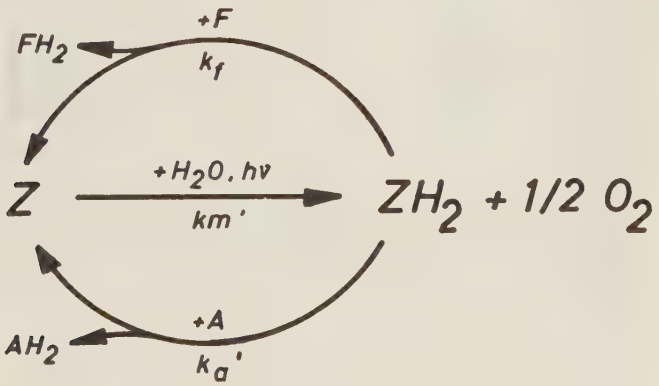
3. Abhängigkeit der Hill-Reaktion von der DCPIP-Konzentration

Eine kinetische Interpretation der korrigierten Reduktionskurven muß mindestens folgende Tatsachen erklären:

a) bei hohen Farbstoffkonzentrationen ($c \approx 10^{-3}$ Mol/l) liegt eine Reaktion nullter Ordnung vor; die Sauerstoffproduktion ist der Farbstoffentfärbung äquivalent.

b) bei niedrigen Farbstoffkonzentrationen ($c = 10^{-4}$ Mol/l) findet bei der Reduktion ein allmählicher Übergang statt von nullter zu erster Ordnung in bezug auf die Farbstoffkonzentration; die Farbstoffreduktion ist möglicherweise nicht der Sauerstoffproduktion äquivalent.

Es zeigte sich, daß das folgende Reaktionsschema alle diese Fälle in zwangloser Weise erklärt:



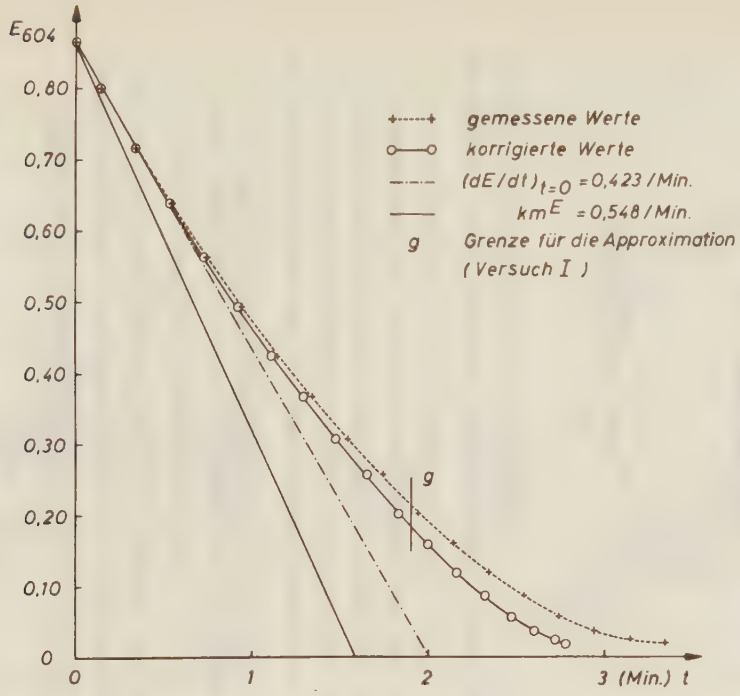


Abb.21a: Rückoxidationskorrektur der Reduktionskurve.
Versuch I (Tabelle 2): 27,7°C, 21 % O_2. Die ausgezogene Gerade gibt den Verlauf der Reduktion im Falle einer reinen Reaktion nullter Ordnung an - vergl. Gl.(40), S.77.

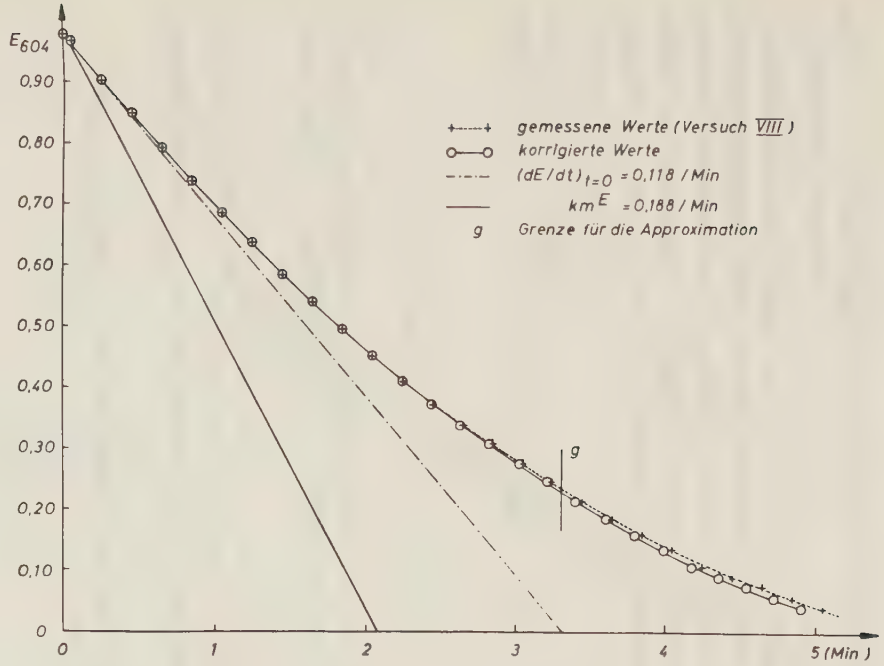


Abb.21b: Rückoxidationskorrektur der Reduktionskurve;
Versuch VIII (Tabelle 2): 29,4°C, 0 % O_2.
Die ausgezogene Gerade gibt den Verlauf der Reduktion im Falle einer reinen Reaktion nullter Ordnung an - vergl. Gl.(40), S.77.

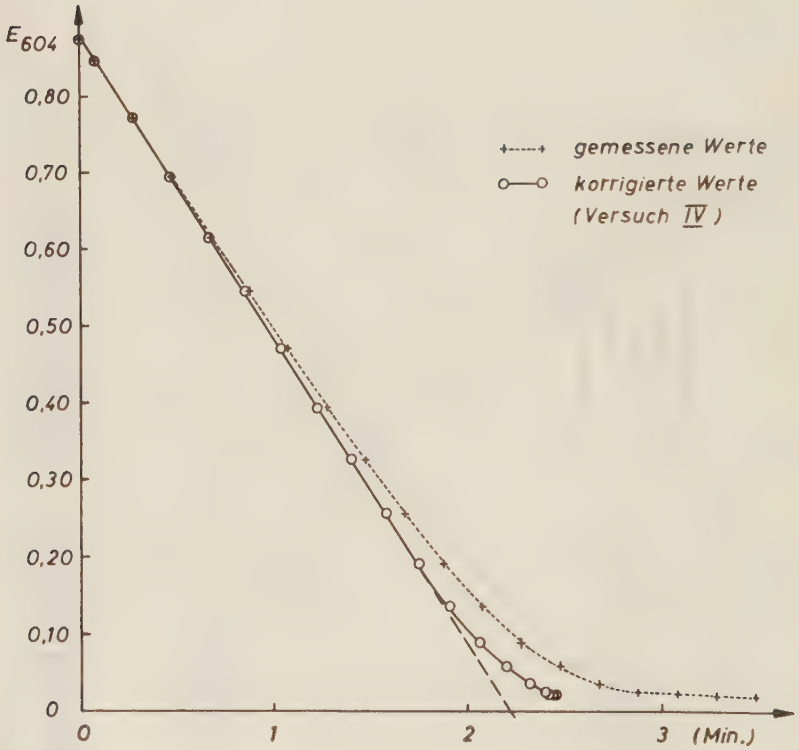


Abb.21c: Rückoxidationskorrektur der Reduktionskurve. Versuch IV (Tabelle 2): 37,2°C, 21 % O_2.

Folgende Reaktionen sind in dem Schema enthalten:

$$Z \quad (+H_2O) \xrightarrow{k_m'} ZH_2 \quad (+\tfrac{1}{2}\,O_2) \qquad (I)$$

$$ZH_2 + F \xrightarrow{k_f} Z + FH_2 \qquad (II)$$

$$ZH_2 + A \xrightarrow{k_a'} Z + AH_2 \qquad (III)$$

dabei soll Z Zwischenprodukt bedeuten, F Farbstoff DCPIP, A irgendein Akzeptor.

Die Reaktion (III) trägt der Möglichkeit Rechnung, daß bei niedrigen Farbstoffkonzentrationen infolge einer Nebenreaktion mehr Sauerstoff produziert wird, als der Farbstoffreduktion entspricht. Es müßte also neben dem Farbstoff noch ein weiterer, zunächst unbekannter Wasserstoffakzeptor A vorhanden sein.

Mit den Bezeichnungen

$[Z] = z$; $[ZH_2] = z_h$; $z + z_h = z_o$; $[A] = a$; $[F] = c$ folgt:

$$\frac{dz_h}{dt} = k_m' z - k_f \cdot z_h \cdot c - k_a' \cdot z_h \cdot a \qquad (27)$$

Im stationären Zustand ist entsprechend der Bodensteinhypothese $dz_h/dt = 0$. Mit $z_h = z_o - z$ folgt aus (27)

$$k_m' z - (k_f \cdot c + k_a' \cdot a) \cdot (z_o - z) = 0 \qquad (28)$$

Subtrahiert man auf beiden Seiten $k_m' \cdot z_o$, so erhält man

$$- k_m' (z_o - z) - (k_f \cdot c + k_a' \cdot a)(z_o - z) = - k_m' z_o \qquad (29)$$

$$z_o - z = \frac{k_m' z_o}{k_m + k_f \cdot c + k_a' \cdot a} \qquad (30)$$

Für die Farbstoffreduktion gilt

$$\frac{dc}{dt} = - k_f \cdot c \cdot z_h = - k_f \cdot c \cdot (z_o - z) \qquad (31)$$

Einsetzen von $z_o - z$ aus Gleichung (30) in (31) gibt

$$\frac{dc}{dt} = - k_f \cdot c \cdot \frac{k_m' z_o}{k_m' + k_f \cdot c + k_a' \cdot a} \qquad (32)$$

$$\boxed{\frac{dc}{dt} = \frac{- k_m' z_o}{1 + \frac{k_m' + k_a' \cdot a}{k_f \cdot c}}} \qquad (33)$$

Gleichung (33) entspricht in der Abhängigkeit der Reduktionsreaktion von der DCPIP-Konzentration der Michaelis-Menten Gleichung. Gleichung (33) ermöglicht bereits eine sinnvolle Diskussion des Verlaufs der Reduktionskurve. Es sind verschiedene Fälle zu unterscheiden:

1) $c \gg (k_m' + k_a' a)/k_f$, d.h. die Farbstoffkonzentration ist sehr groß. Das zweite Glied im Nenner der rechten Seite von Gleichung (33) ist dann gegen 1 zu vernachlässigen. Es liegt eine reine Reaktion nullter Ordnung vor. Die Geschwindigkeit der Reduktion ist konstant, weil bei dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt (I) $Z \xrightarrow{k_m'} ZH_2$ die Konzentration an Z ungefähr gleich z_o ist und z_o konstant ist.

   Die Sauerstoffproduktion und die Farbstoffreduktion sind äquivalent. Die Bestimmung von beidem eignet sich in gleicher Weise zur Definition der Hill-Aktivität.

2a) $a = 0$ (Neben DCPIP liegt kein weiterer Wasserstoffakzeptor vor).
   Mit abnehmender Farbstoffkonzentration c findet dann der Übergang der Reduktionsreaktion von nullter zu erster

Ordnung statt. Für $k_m'/k_f \cdot c \gg 1$ folgt

$$\frac{dc}{dt} = - k_f \cdot z_o \cdot c \qquad (34)$$

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist dann Reaktion (II). Es liegt eine reine Reaktion erster Ordnung vor; eine Aussage über die wahre Hill-Aktivität ist nicht mehr möglich, wenn die Hill-Aktivität unabhängig von der Farbstoffkonzentration c sein soll. Trotzdem sind Farbstoffreduktion und Sauerstoffproduktion immer noch äquivalent.

2b) Die Konzentration a eines Wasserstoffakzeptors neben dem Farbstoff DCPIP sei ungleich null. Hier ist folgender Fall besonders interessant:
Es gelte $k_m'/k_f \cdot c \ll 1$, so daß bei a = 0 eine Reaktion nullter Ordnung vorläge. Nun sei aber k_m' sehr viel kleiner als $k_a' \cdot a$; $k_a' \cdot a$ sei identisch mit k_a und sei konstant. Dann findet der Übergang zu einer Reaktion erster Ordnung schon bei wesentlich höheren Farbstoffkonzentrationen c statt als im Fall 1) und die Sauerstoffproduktion ist größer als der Farbstoffreduktion entspricht.

Die Sauerstoffproduktion kann konstant sein, solange Reaktion (I) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, d.h. solange Reaktion (II) und (III) zusammen wesentlich schneller Wasserstoff verbrauchen, als er durch (I) nachgeliefert werden kann.

Die Integration von (33) unter der Annahme, daß a konstant und $k_a' \cdot a$ identisch gleich k_a ist, führt zu

$$\int_{c_o}^{c} \left(1 + \frac{k_m' + k_a}{k_f} \cdot \frac{1}{c}\right) dc = - k_m' z_o \int_{o}^{t} dt \qquad (35)$$

Setzt man $\frac{k_m' + k_a}{k_f} \equiv b$ und $k_m' z_o \equiv k_m$, so folgt aus Gleichung (35)

$$\int_{c_o}^{c} (1 + \frac{b}{c}) dc = - k_m \int_{o}^{t} dt$$

$$(c - c_o) - b \ln \frac{c_o}{c} = - k_m t$$

$$\boxed{c_o - c + b \ln \frac{c_o}{c} = k_m \cdot t} \qquad (36)$$

Unter der Voraussetzung, daß alle gemachten Annahmen zutreffen, müssen sich die korrigierten Reduktionskurven durch Gleichung (36) beschreiben lassen. Die Konstante k_m ist gleich der auf unendliche Farbstoffkonzentration extrapolierten Hill-Aktivität. Gleichung (36) gibt also die Möglichkeit, die maximale Hill-Aktivität auch dann zu berechnen, wenn die Farbstoffreduktion nicht exakt nullter Ordnung ist.

Prinzipiell könnte man b und k_m durch ein graphisches Verfahren bestimmen. Eine Division von Gleichung (36) durch t gibt:

$$\frac{c_o - c}{t} = k_m - b \frac{1}{t} \cdot \ln (\frac{c_o}{c}) \qquad (37)$$

$\frac{c_o - c}{t}$ gegen $\frac{1}{t} \ln (\frac{c_o}{c})$ aufgetragen gibt eine Gerade mit dem Ordinatenabschnitt k_m und der Steigung b. Das Verfahren hat aber den Nachteil, daß bei dieser Art des Auftragens wegen der Unsicherheit von t_o ($\pm$ 2 sec) gerade die ersten, besonders zuverlässigen Meßpunkte sehr stark streuen und deshalb nicht benutzt werden können. -

Ein anderes Verfahren wurde deshalb bevorzugt: Setzt man in Gleichung (36) statt der Farbstoffkonzentration c die Extinktion E ein, so erhält man

$$E - E_o + k_m^E \cdot t = b^E \cdot \ln \frac{E_o}{E} \qquad (38)$$

Da in der verwendeten Meßanordnung

$\varepsilon \cdot d = 1{,}66 \cdot 10^4$ (l/Mol·cm) · 0,6 cm = $1{,}00 \cdot 10^4$ (l/Mol)

und also

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d} = E \cdot 1{,}00 \cdot 10^{-4} \text{ Mol/l (Abb.8a) ist,}$$

sind in Gleichung (38)

$$k_m^E = (10^4 \text{ l/Mol}) \cdot k_m$$

$$b^E = (10^4 \text{ l/Mol}) \cdot b$$

Es wird ausgehend von Gleichung (38) $y = E - E_o + k_m^E t$ gegen ln (E_o/E) aufgetragen. k_m^E wurde solange systematisch variiert, bis die y-Werte in einem möglichst großen Bereich auf einer Geraden lagen. Als Ausgangswert bei der Variation von k_m^E wurde die graphisch bestimmte Anfangssteigung $(dE/dt)_{t=0}$ genommen.

Die Kurven wurden mit Hilfe eines Computers berechnet. Abb.22a,b zeigen $E - E_o + k_m^E \cdot t$ aufgetragen gegen $\ln(E_o/E)$ für verschiedene Werte von k_m^E ; k_m^E ist die Anfangssteigung der Reduktionskurve multipliziert mit einem Faktor R.

Man sieht, daß sich der beste Wert von k_m^E auf etwa ± 5 % genau bestimmen läßt. Aus der Steigung der Geraden gewinnt man die Konstante b^E, die den Grad der Abweichung von einer Reaktion nullter Ordnung bestimmt.

Aus k_m^E, b^E und E_o läßt sich die Anfangssteigung $(dE/dt)_{t=0}$ nach Gleichung (33) berechnen:

$$\frac{dE}{dt} = \frac{-k_m^E}{1 + b^E/E} \qquad (39)$$

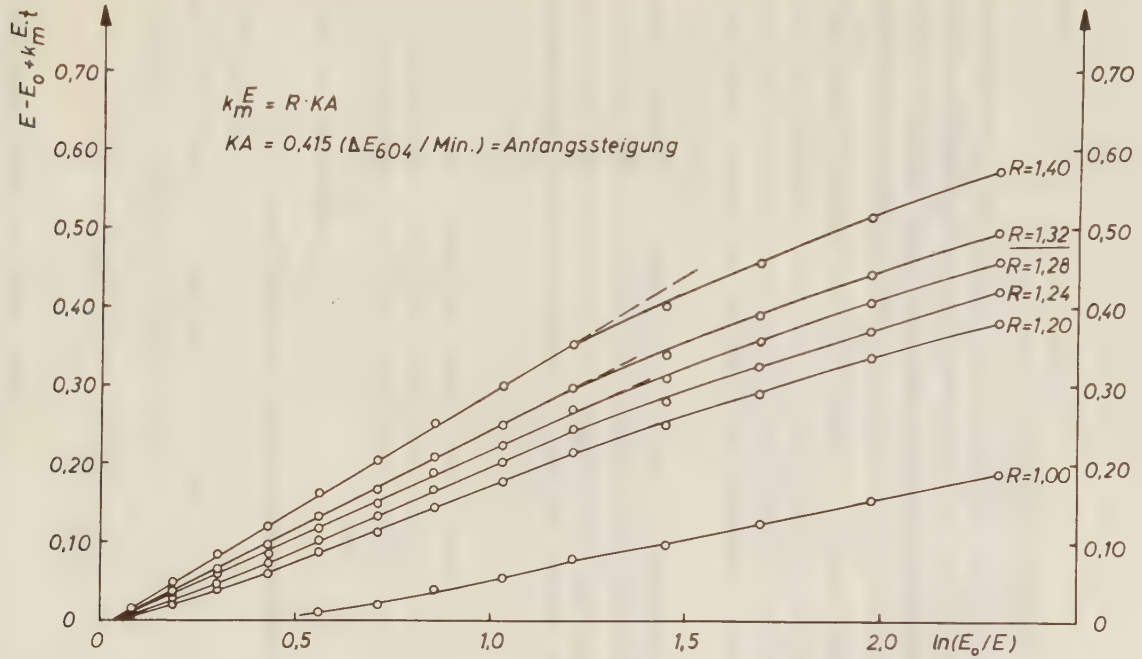


Abb.22a: Bestimmung der maximalen Hill-Aktivität nach Gl.(38) durch systematische Variation von k_m^E;
Versuch I (Tabelle 2): 27,7°C, 21 % O_2 - die Extinktionen E sind die korrigierten Werte von Abb.21a.

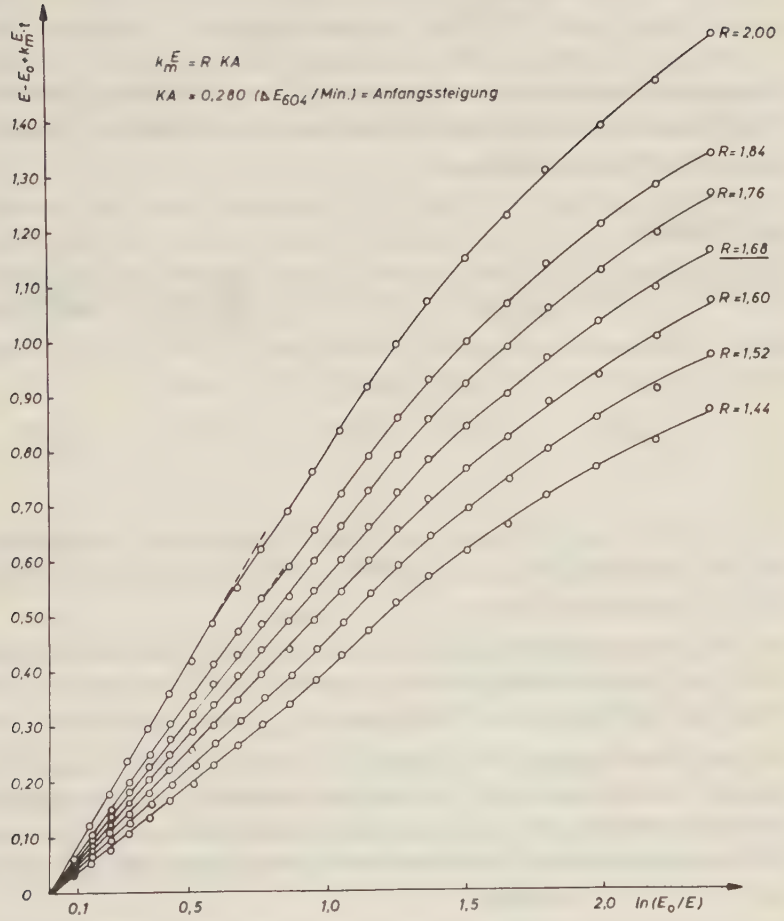


Abb.22b: Bestimmung der maximalen Hill-Aktivität nach Gl.(38) durch systematische Variation von k_m^E; Versuch VIII (Tabelle 2): 29,4°C, 0 % O_2 - die Extinktionen E sind die korrigierten Werte von Abb.21b.

oder bei t = 0

$$\left(\frac{dE}{dt}\right)_{t=0} = - \frac{k_m^E}{1 + b^E/E_o} \qquad (40)$$

In Abb.21a,b sind die Steigungen k_m^E und $(dE/dt)_{t=0}$ nach Gleichung (39) berechnet, eingezeichnet. Tabelle 3 enthält die berechneten Werte:

Tabelle 3:

Versuch	k_m^E [Min^{-1}]	b^E	E_o	$\left(\frac{dE}{dt}\right)_{t=0}$ berechnet	$k_m^E/\left(\frac{dE}{dt}\right)_{t=0}$
VIII.	0,470	0,570	0,975	0,295	1,6
I.	0,548	0,254	0,865	0,423	1,3

Die letzte Spalte zeigt, um welchen Faktor die in üblicher Weise bestimmten Hill-Aktivitäten kleiner sind als die maximal zu messenden Werte.

Es ist bemerkenswert, daß sich der Wert k_m^E von dem Versuch VIII gut in die Meßergebnisse anderer Versuche einfügt, während der unkorrigierte Wert $(dE/dt)_{t=0}$ viel zu niedrig ist.

Zu den Abweichungen der Kurven in Abb.22a,b von Geraden bei großen Werten von $\ln(E_o/E)$ ist zu bemerken: Bei der Messung der Extinktion sind systematische Fehler bis zu $E = \pm 0{,}01$ nicht auszuschließen; die Sauerstoffkorrektur ist höchstens auf $\pm$ 20 % zuverlässig.

Berücksichtigt man beide Fehlermöglichkeiten, dann kann man bei $\ln(E_o/E) = 2{,}3$, (d.h. $E/E_o = 0{,}1$) etwa die Hälfte der Abweichungen von einer Geraden damit erklären. Angemessen ist aber wohl, die Abweichungen nicht als Folge systemati-

scher Meßfehler zu betrachten, sondern als Beweis dafür, daß das zugrunde liegende Reaktionsschema noch zu einfach ist (vergl. Punkt 4. der Einleitung der Kinetik: die mit der Farbstoffreduktion gekoppelte ATP-Bildung wurde in das Schema nicht mit einbezogen). Es wäre daher interessant, die Brauchbarkeit des Extrapolationsverfahrens durch Messungen bei höheren Farbstoffkonzentrationen nachzuprüfen.

Auf jeden Fall lassen sich die Abweichungen der Reduktionskurven von einer Geraden (d.h. von einer Reaktion nullter Ordnung) mit einer einzigen zusätzlichen Konstanten, b, in einem großen Konzentrationsbereich beschreiben; dabei hat die Konstante b eine kinetische Bedeutung.

IV. DISKUSSION [+)]

A. Einleitung

Im vorangehenden Kapitel wurde versucht, die Reduktion von DCPIP durch zwei Reaktionsgleichungen zu beschreiben. Nach diesem Schema findet mit abnehmender DCPIP-Konzentration ein kontinuierlicher Übergang von einer Reaktion nullter Ordnung zu einer Reaktion erster Ordnung statt.

Der Konzentrationsbereich, in welchem dieser Übergang stattfindet, wird durch eine Konstante b bestimmt. Dieser Übergang wird zu höheren Farbstoffkonzentrationen verschoben, wenn neben der Farbstoffreduktion eine Konkurrenzreaktion

$$ZH_2 + A \longrightarrow Z + AH_2$$

mit einer konstanten Konzentration [A] abläuft. Die Reduktion wird dann formal zwar noch durch denselben Ausdruck beschrieben, b nimmt aber einen höheren Wert an und hat auch eine andere Bedeutung (s.Gl.(33)). Es läßt sich also nicht unterscheiden, ob der Übergang zu einer Reaktion erster Ordnung allein dadurch bestimmt ist, daß die Reduktion von DCPIP der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt wird, oder ob eine Konkurrenzreaktion vorliegt, die den Übergang zu einer Reaktion erster Ordnung verursacht.

Im folgenden wird durch den Vergleich mit Arbeiten anderer Autoren gezeigt, daß unter den Versuchsbedingungen die CO_2-Reduktion als Konkurrenzreaktion auftreten kann. Auch nach Einbeziehung einer Konkurrenzreaktion zur DCPIP-Reduktion ist das Reaktionsschema sicher noch viel zu einfach. Eine Reihe weiterer Möglichkeiten, wie man Abweichungen von einer

---

[+)] Vergleiche mit den Ergebnissen anderer Autoren sind, soweit sie nur die Meßtechnik betreffen, schon im experimentellen Teil enthalten.

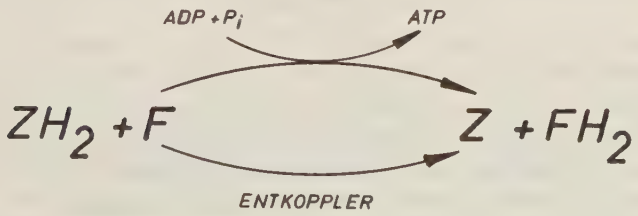
Reaktion nullter Ordnung erklären kann, soll diskutiert werden.

B. Zusammenhang zwischen DCPIP-Reduktion und Photophosphorylierung

In der Einleitung wurde bereits die doppelte Rolle erwähnt, die DCPIP spielt:

Es wirkt als Oxidationsmittel - wie andere Hill-Reagenzien auch - , darüber hinaus wirkt DCPIP bei Konzentrationen größer als $5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l aber auch als Entkoppler der Photophosphorylierung. Zur Erklärung der Wirkungsweise eines Entkopplers sind im wesentlichen zwei Hypothesen vorgebracht worden:

a) Durch die Anwesenheit des Entkopplers wird ein neuer, schnellerer Reaktionsweg ("short cut") eröffnet, an den keine Photophosphorylierung mehr gekoppelt ist. Im Falle des DCPIP würde das bedeuten, daß es auf einem anderen Wege reduziert würde als die übrigen Hill-Reagenzien.

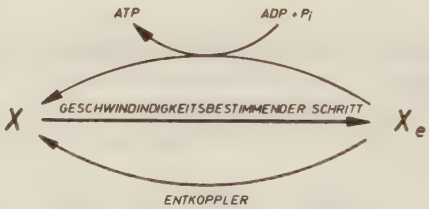


Diese Ansicht wurde u.a. von Vernon vertreten, vergl. Gromet-Elhanan (1964).

b) Nach Shen et al. (1962), bzw. Hind and Jagendorf (1963) tritt als Zwischenstufe eine Verbindung X in einem energiereichen Zustand X_e auf.

Die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion wird durch die

Konzentration von X kontrolliert, also auch durch die Geschwindigkeit, mit welcher X_e in X übergeht.



Wenn mit der Farbstoffreduktion eine ATP-Bildung gekoppelt ist, bedeutet das, daß die Geschwindigkeit des Übergangs $X_e \longrightarrow X$ durch die ATP-Bildung kontrolliert wird; z.B. könnte X_e eine energiereiche Verbindung $X \sim P$ (Stiller, Vennesland (1962), Stiller (1965)) darstellen

$$X \sim P + ADP \longrightarrow X + ATP$$

Um bei diesem Beispiel zu bleiben: Die Wirkung eines Entkopplers bestünde hier in der Katalyse der Reaktion

$$X \sim P \xrightarrow{\text{Entkoppler}} X + P$$

Die Hypothese b) trifft nach den Arbeiten von Shen et al. (1963) und von Gromet-Elhanan, Avron (1963) und (1964) sehr wahrscheinlich zu. Wegen der weitgehenden Gleichartigkeit der Ergebnisse der beiden Arbeitsgruppen wird nur auf die Arbeit von Shen et al. (1963) Bezug genommen.

Beim Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen von Shen et al. (1963) fällt zunächst auf, daß das Konzentrationsgebiet zwischen 10^{-5} und 10^{-4} Mol DCPIP/l, in welchem sich der Übergang von nullter zu erster Ordnung besonders bemerkbar macht, zugleich auch den Übergangsbereich von keiner ATP-Bildung zu ATP-Bildung darstellt.

Zum Vergleich sei Tabelle 1 von Shen et al. (1963), z.T. verändert, angeführt:

DCPIP Mol/l	Reduktionsgeschw. $\frac{\text{Mol DCPIPH}_2}{\text{mg Chl.·Std}} \cdot 10^6$	$\frac{\text{Mol ATP}}{\text{mg Chl.·Std}} \cdot 10^6$	$\frac{\Delta \text{ ATP}}{\Delta \text{DCPIPH}_2}$
$23{,}8 \cdot 10^{-5}$	670	15	0,02
$11{,}4 \cdot 10^{-5}$	590	138	0,23
$5{,}7 \cdot 10^{-5}$	446	167	0,37
$2{,}9 \cdot 10^{-5}$	400	422	1,05
$1{,}4 \cdot 10^{-5}$	440	458	1,04

Das könnte ein Zufall sein; folgende Erklärung trifft aber wahrscheinlich eher zu:
Es sollen die Voraussetzungen erfüllt sein:

a) Intakte, von einer Membran umschlossene Chloroplasten liegen vor;

b) die Reduktion von DCPIP findet innerhalb der Membran statt;

c) die entkoppelnde Wirkung von DCPIP besteht in einem Eingriff in Reaktionen innerhalb der Membran.

Mit abnehmender Farbstoffkonzentration wird nun das Angebot an Elektronen größer als die Geschwindigkeit, mit welcher Farbstoffmoleküle in die Chloroplasten hineindiffundieren. Die Reduktionsgeschwindigkeit sei $(\frac{dc}{dt}) = \frac{1}{2} k_m$. Im Rahmen des Reaktionsschemas auf Seite 66 bedeutet das:

$$z_h = \frac{1}{2} z_o$$

(Bei hohen Farbstoffkonzentrationen ist dagegen $z_h \ll z_o$).

Wegen der viel höheren Konzentration an ZH_2 im Übergangsbereich bei kleinen Farbstoffkonzentrationen werden die Farbstoffmoleküle sehr schnell reduziert, und es ist durchaus möglich, daß die Konzentration an DCPIP im Innern der Chloroplasten um ein Vielfaches kleiner ist als außerhalb der Chloroplasten, in der Lösung. DCPIP wirkt aber nur in der oxidierten Form als Entkoppler.

Diese Erklärung wird auch durch eine Beobachtung von Shen et al. (1963) gestützt: Ferricyanid wird wegen seines höheren Redoxpotentials viel leichter reduziert als DCPIP. In Gegenwart von Ferricyanid wirkt deshalb DCPIP nur als Entkoppler und nicht als Oxidans. Es stellte sich heraus, daß bei einer DCPIP-Konzentration von $6 \cdot 10^{-5}$ Mol/l die ATP-Bildung ohne Ferricyanid zu ca. 50 % entkoppelt ist (bezogen auf den Maximalwert der ATP-Bildung), mit Ferricyanid aber zu 90 %.

Bei den in der vorliegenden Arbeit angeführten Versuchen wurde die Photophosphorylierung als möglicher geschwindigkeitsbestimmender Schritt nicht berücksichtigt. Es wurden weder ADP und Phosphat in Substratmengen zugesetzt, noch ein Entkoppler. Man muß deshalb damit rechnen, daß bei kleinen Farbstoffkonzentrationen auch die Photophosphorylierung als geschwindigkeitsbegrenzender Schritt auftreten kann.

Tatsächlich wurde auch von verschiedenen Autoren beobachtet, daß bei DCPIP-Konzentrationen kleiner als $5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l die Reduktionsgeschwindigkeit durch Zusatz von ADP und Phosphat oder von Entkopplern erhöht werden kann (Gromet-Elhanan (1963), West and Hill (1967)).

Für die weitere Diskussion genügt es, zu zeigen, daß die Photophosphorylierung nicht geschwindigkeitsbestimmend sein muß. Stiller und Vennesland (1962) haben ein Zwischenprodukt $X \sim P$ postuliert, dessen Stabilität mit zunehmendem pH rasch abnehmen soll. Man kann nun drei Wege vergleichen:

$$X \sim P \xrightarrow{OH^-} X + P \qquad (a)$$

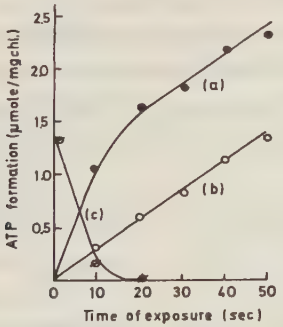
$$X \sim P \xrightarrow{ADP} X + ATP \qquad (b)$$

$$X \sim P \xrightarrow{\text{Entkoppler}} X + P \qquad (c)$$

Damit die Photophosphorylierung nicht geschwindigkeitsbestimmend ist, genügt es offensichtlich zu fordern, daß bereits die langsamste Reaktion (a) so schnell abläuft, daß die Konzentration an X ungefähr gleich der maximalen Konzentration an X ist.

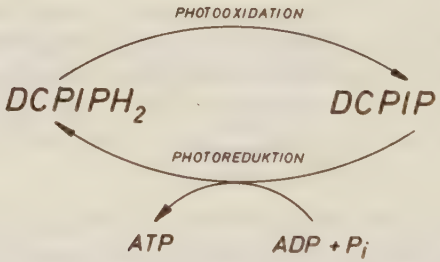
Liegt, wenn alles DCPIP reduziert ist, eine zyklische oder eine nicht-zyklische Photophosphorylierung vor?
Shen et al. (1963) konnten zeigen, daß bei DCPIP-Konzentrationen kleiner als $3 \cdot 10^{-5}$ Mol/l eine an die DCPIP-Reduktion gekoppelte ATP-Bildung auftritt.

Ist DCPIP vollständig reduziert, dann ist die ATP-Bildung auf etwa 1/4 der anfänglichen ATP-Bildung gesunken, wie Abb.1 aus Shen et al. (1963) zeigt.



a) ATP-Bildung im DCPIP-System ($2{,}9 \cdot 10^{-5}$ Mol/l)
b) ATP-Bildung im $DCPIPH_2$-System ($2{,}9 \cdot 10^{-5}$ Mol/l)
c) Photoreduktion von DCPIP

Die ATP-Bildung im stationären Zustand ist der Konzentration an $DCPIPH_2$ proportional. Die Autoren konnten zeigen, daß die durch $DCPIPH_2$ vermittelte ATP-Bildung und die an die DCPIP-Reduktion gekoppelte ATP-Bildung sich nicht additiv verhalten, sondern daß die erstere erst dann einsetzt, wenn die Reduktion praktisch abgeschlossen ist. Nach der Ansicht der Autoren müßte die ATP-Bildung allein durch folgendes vereinfachendes Schema wiedergegeben werden:



(dabei ist die ATP-Bildung, die ja nach Shen et al. (1962) und Hind et al. (1963) eine Dunkelreaktion ist, als Folgereaktion der DCPIP-Photoreduktion anzusehen).

(Nach Krogmann und Vennesland (1959) wäre umgekehrt gerade die Photooxidation mit einer ATP-Bildung gekoppelt).

Die Vermutung liegt nun nahe, daß die "Photooxidation" im Schema in Wirklichkeit eine Dunkelreaktion ist. Unter ähnlichen Bedingungen wurde in dieser Arbeit (Versuch I., Tabelle 2) bei 27,7°C, Durchleiten von Preßluft, 20 mg Chlorophyll/l und einer DCPIP-Anfangskonzentration c_o = $0{,}865 \cdot 10^{-4}$ Mol/l für die Rückoxidation unmittelbar nach Abschalten des Lichts gemessen:

$$\left(\frac{dc}{dt}\right)_{t_1} = 4{,}9 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l} \cdot \text{Min}$$

Bei einer Farbstoffkonzentration von $DCPIPH_2$ = $0{,}29 \cdot 10^{-4}$ Mol/l hätte man beobachtet:

$$\left(\frac{dc}{dt}\right)_{t_1} = 1{,}6 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l·Min.}$$

Aus der Arbeit von Shen et al. (1963) (Abb. S. 84) entnimmt man für eine $DCPIPH_2$-Konzentration von $2{,}9 \cdot 10^{-5}$ Mol/l die ATP-Bildungsrate

$$\frac{1{,}7 \cdot 10^{-6} \text{ Mol ATP}}{\text{mg Chlorophyll·Min}}$$; bei einer Chlorophyllkonzentration von ca. 10 mg/l folgt für die ATP-Bildungsrate

$$1{,}7 \cdot 10^{-5} \text{ Mol ATP/l·Min.}$$

Der Vergleich mit der abgeschätzten Geschwindigkeit der Rückoxidation von $DCPIPH_2$ im Dunkeln zeigt, daß die ATP-Bildungsrate um eine Größenordnung höher liegt.

Shen et al. (1963) beziehen ihre ATP-Bildungsraten auf die Chlorophyllmenge - sie implizieren also, daß die ATP-Bildungsgeschwindigkeit auch im stationären Zustand der Chlorophyllkonzentration proportional ist. Tatsächlich haben sie aber die Abhängigkeit von der Chloroplastenkonzentration gar nicht untersucht!

Im Gegensatz dazu müßte eine auf der Reaktionsfolge

$$FH_2 + \tfrac{1}{2}\, O_2 \xrightarrow{\text{Dunkel}} F + H_2O$$

$$F + H_2O \xrightarrow[\text{ADP, } P_i]{\text{Licht}} FH_2 + \tfrac{1}{2}\, O_2 + ATP$$

beruhende ATP-Bildung praktisch unabhängig von der Chloroplastenkonzentration sein, solange die Konzentration an $DCPIPH_2$ ungefähr gleich der Ausgangskonzentration ist.

(Dabei ist anzunehmen, daß die Rückoxidation proportional der Sauerstoffkonzentration und der Konzentration an reduziertem Farbstoff ist).

Folgende Alternativen, warum die ATP-Bildung mit $DCPIPH_2$ um eine Größenordnung größer ist als die Rückoxidation von $DCPIPH_2$ sind abzuwägen:

a) Die Rückoxidationsrate ist im Licht tatsächlich um eine Größenordnung höher als im Dunkeln.
Dagegen spricht aber: Im stationären Zustand und kurz vor Erreichen des stationären Zustands ist die Reduktion praktisch eine reine Reaktion erster Ordnung. Hier lassen sich Reduktion und gleichzeitige Rückoxidation geschlossen behandeln. Die Rückoxidationsgeschwindigkeit läßt sich einmal aus dem Teil der Reduktionskurve vor dem Erreichen des stationären Zustands berechnen, zum anderen aus der Rückoxidation nach dem Abschalten des Lichtes. Die auf verschiedenem Wege berechneten Konstanten sind ungefähr gleich, d.h. eine gegenüber der Dunkeloxidation 10 mal schnellere Photooxidation ist auszuschließen.

b) Es findet tatsächlich eine zyklische Photophosphorylierung unter der Beteiligung von $DCPIPH_2$ statt. Die Rolle, die $DCPIPH_2$ dabei spielt, ist aber noch unklar.

Um diese Fragen zu klären, müßte man die Photophosphorylierung mit $DCPIPH_2$ in Abhängigkeit von der Chloroplastenkonzentration und von der Sauerstoffkonzentration untersuchen.

C. Ort der DCPIP-Reduktion

Es wurde bisher angenommen, daß die Farbstoffmoleküle im Innern der Chloroplasten reduziert werden. Es ist aber nicht auszuschließen, daß an die Membran gebundene wasserstoffübertragende Enzyme vorliegen. Bezieht man sich auf das Schema (siehe S.66), dann kann man sich vorstellen,

daß ZH_2 seinen Wasserstoff an ein solches membrangebundenes Enzym abgibt, das dann seinerseits DCPIP reduziert.

Dieser zweite Reduktionsweg hätte den Vorteil, daß die Diffusion von DCPIP durch die Membran, die bei kleinen DCPIP-Konzentrationen evtl. geschwindigkeitsbestimmend ist, entfiele.

D. CO_2-Fixierung als Nebenreaktion zur DCPIP-Reduktion

Aus der Arbeit von Walker and Hill (1966) kann man entnehmen, daß auch ohne Zusatz von Zwischenprodukten des Calvinzyklus, z.B. 3-Phosphoglycerat oder Ribose-5-Phosphat, eine CO_2-Fixierung durch Chloroplasten möglich ist:

Chloroplasten von vorbelichteten Erbsenblättern produzieren bei Lichtsättigung und 18°C nach 5 Minuten Belichtung $8{,}2 \cdot 10^{-8}$ Mol O_2 / mg Chlorophyll · Min.; das entspricht bei 29°C etwa $1{,}3 \cdot 10^{-7}$ Mol O_2 / mg Chlorophyll · Min. Da die Menge an produziertem Sauerstoff nach Walker and Hill (1966) der Menge an fixiertem CO_2 äquivalent ist, (- 1 DCPIP ≙ + ½ O_2 ≙ - ½ CO_2), werden also bei 29°C ohne Zusätze $1{,}3 \cdot 10^{-7}$ Mol CO_2/mg Chl.·Min. fixiert.

Vergleicht man diesen Wert mit der DCPIP-Reduktion in der vorliegenden Arbeit und bezieht den Vergleich auf die Sauerstoffproduktion, so kann man feststellen, daß bei DCPIP 10^{-5} Mol/l die CO_2-Fixierung in die gleiche Größenordnung wie die DCPIP-Reduktion kommt und damit als Konkurrenzreaktion in Frage kommt.

Als Beispiel sei der Versuch VIII angeführt:

$k_m'' = 1{,}5 \cdot 0{,}470 \cdot 10^{-4}$ Mol $DCPIPH_2$/20 mg Chl.·Min.

$k_m'' = 3{,}46 \cdot 10^{-6}$ Mol $DCPIPH_2$/mg Chl.·Min.

$k_m'' \triangleq 1{,}73 \cdot 10^{-6}$ Mol O_2/mg Chl.·Min.

(k_m'' ist die maximale Hill-Aktivität k_m bei hohen DCPIP-Konzentrationen bezogen auf 1 mg Chlorophyll/l multipliziert

mit dem Faktor 1,5; dieser Faktor berücksichtigt, daß nur 2/3 des Volumens bestrahlt wurde - s. S.15).

Nach Gleichung (39) gilt für die Hill-Aktivität bei einer bestimmten DCPIP-Konzentration c:

$$\frac{dc}{dt} = \frac{-k_m}{1 + b/c}$$

Bei Versuch VIII wurde für b gefunden:
$b = 5{,}7 \cdot 10^{-5}$ Mol/l. Daraus ergibt sich die Hill-Aktivität als Funktion von c:

Tabelle 4:

$c \cdot 10^5$ [Mol/l]	$\frac{1}{1 + b/c}$	$\frac{dc}{dt}$ $\left[\frac{\text{Mol DCPIP}}{\text{Min·mg Chl.}}\right]$
5,7	0,50	$8{,}6 \cdot 10^{-7}$
2,8	0,33	$5{,}8 \cdot 10^{-7}$
1,4	0,25	$4{,}3 \cdot 10^{-7}$
0,7	0,11	$1{,}9 \cdot 10^{-7}$
$0{,}3_5$	0,06	$1{,}0 \cdot 10^{-7}$

Die Werte in Tabelle 4 zeigen, daß bei etwa $0{,}5 \cdot 10^{-5}$ Mol DCPIP/l die Reduktion von DCPIP und von CO_2 gleichschnell verlaufen würden, bezogen auf die Sauerstoffproduktion.

Nach Warburg (1965) ist die Anwesenheit von CO_2 im Medium erforderlich, damit die Hill-Reaktion überhaupt ablaufen kann. West and Hill (1967) untersuchten die Abhängigkeit der DCPIP-Reduktion von der CO_2-Konzentration und stellten fest, daß für einen optimalen Ablauf der DCPIP-Reduktion eine bestimmte CO_2-Konzentration im Medium erforderlich ist (meist wurde mit $4 \cdot 10^{-2}$ Mol $KHCO_3$/l gearbeitet). Mit

steigendem pH nimmt der CO_2-Effekt ab; bei pH 7,5 war der CO_2-Effekt praktisch gleich Null (West and Hill 1967); vermutlich löst sich bei diesem pH beim Arbeiten an der Luft genügend CO_2 in den von CO_2 befreiten Puffergemischen. Ebenso stellten Walker and Hill (1966) bei ihren Versuchen zur CO_2-Fixierung durch Chloroplasten fest, daß auch ohne speziellen Zusatz von CO_2 (in Form von $NaHCO_3$) Sauerstoff anfänglich genauso schnell produziert wird wie mit Zusatz von CO_2. Erst nach 10 bis 15 Minuten Bestrahlung, wenn das vorhandene CO_2 zum größten Teil reduziert ist, nimmt die Sauerstoffproduktion ab; Zusatz von $NaHCO_3$ führt dann zu einem Wiederanstieg der Sauerstoffproduktion (Walker and Hill 1966, Abb.2).

Diese Beobachtungen führen zu dem Schluß, daß die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Puffergemische (pH 7,6) genügend CO_2 gelöst enthielten - sowohl für einen optimalen Ablauf der Hill-Reaktion als auch für eine CO_2-Fixierung als Nebenreaktion.

Wenn man annimmt, daß als Nebenreaktion zur DCPIP-Reduktion eine CO_2-Fixierung stattfindet, so ist die Sauerstoffproduktion größer als allein der Farbstoffreduktion entsprechen würde. Leider liegen in der Literatur keine Werte über die Sauerstoffproduktion während der Reduktion von DCPIP-Konzentrationen kleiner als $5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l vor; es kommen nur elektrochemische Messungen in Frage, da man bei Warburg-Versuchen mit viel höheren Konzentrationen der Hill-Oxidantien arbeiten muß. Die Nichtäquivalenz von Farbstoffreduktion und Sauerstoffproduktion dürfte nur schwer mit Sicherheit festzustellen sein, weil bei der Rückoxidation von $DCPIPH_2$ Sauerstoff verbraucht wird, der bei der CO_2-Fixierung frei wurde. Aussichtsreicher ist es, die CO_2-Fixierung direkt mit ^{14}C nachzuweisen.

E. Verhältnis von intakten zu nicht intakten Chloroplasten

Nach Walker (1965) zeigen membranfreie Chloroplasten eine verminderte Fähigkeit zur CO_2-Fixierung, d.h. also, daß bei nicht intakten Chloroplasten die CO_2-Fixierung auch als Nebenreaktion zur Farbstoffreduktion nur noch eine geringe Rolle spielen kann. Weiterhin entfällt bei membranfreien Chloroplasten die bei kleinen DCPIP-Konzentrationen möglicherweise geschwindigkeitsbestimmende Diffusion von DCPIP durch die Membran. Es ist also zu erwarten, daß bei der Reduktion durch nicht intakte, membranfreie Chloroplasten erst bei kleineren DCPIP-Konzentrationen Abweichungen von einer Reaktion nullter Ordnung auftreten als bei intakten Chloroplasten. Bei einer Versuchstemperatur von 25 - 30°C lagen zu etwa 2/3 intakte Chloroplasten vor. Auf Grund der angeführten Überlegungen überrascht es deshalb nicht, daß bei 37°C, wo nur wenige intakte Chloroplasten vorliegen, in einem besonders großen Konzentrationsbereich (von 10^{-4} bis ca. 10^{-5} Mol DCPIP/l) eine Reaktion nullter Ordnung beobachtet wurde (s.Abb.21b). Das zeigt aber auch, daß bei einer vollständigen Analyse der Reduktionskurven das Verhältnis intakter zu nicht intakten Chloroplasten als Parameter berücksichtigt werden müßte.

F. Deutung der erhöhten Rückoxidationsgeschwindigkeit[+)] von $DCPIPH_2$ gleich nach dem Abschalten des Lichtes

Walker and Hill (1967) beobachteten bei CO_2-Fixierungsversuchen in Gegenwart von Isoascorbat unmittelbar nach dem Abschalten des Lichts eine wesentlich schnellere Aufnahme

---

[+)] Unter Rückoxidationsgeschwindigkeit soll im folgenden der von der $DCPIPH_2$-Konzentration unabhängige Ausdruck

$$\frac{d \ln [DCPIPH_2]}{dt} = \frac{1}{[DCPIPH_2]} \cdot \frac{d [DCPIPH_2]}{dt}$$

verstanden werden.

von Sauerstoff als einige Zeit später (elektrochemische Messungen).

Das kann bedeuten, daß die Sauerstoffaufnahme eine Reaktion erster Ordnung in Bezug auf die Sauerstoffkonzentration ist. Versteht man aber die Aussage der Autoren so, daß selbst unter Annahme einer Reaktion erster Ordnung die Sauerstoffaufnahme anfänglich schneller verläuft, dann würde sich ihre Beobachtung mit den Ergebnissen dieser Arbeit decken. Das würde bedeuten, daß der Ansatz

$$\frac{d\,[DCPIPH_2]}{dt} = - k_r \cdot [O_2] \cdot [DCPIPH_2]$$

zwar korrekt ist, aber k_r unmittelbar nach dem Abschalten des Lichts einen höheren Wert hat, d.h. daß die Rückoxidation in irgendeiner Weise katalysiert wird.

Diese Erklärung würde die Postulierung eines zusätzlichen Oxidationsmittels neben Sauerstoff überflüssig machen.

Einen entgegengesetzten Standpunkt nimmt man ein, wenn man postuliert, daß bei kleinen DCPIP-Konzentrationen als weitere Nebenreaktion außer der CO_2-Reduktion auch eine Mehler-Reaktion abläuft, bei der Sauerstoff zu H_2O_2 reduziert wird. (Mehler 1951, Grishina and Voskresenskaya 1964, 1966, Bekina et al. 1966, Malkin 1968).

H_2O_2 könnte dann die anfänglich erhöhte Rückoxidationsgeschwindigkeit von $DCPIPH_2$ verursachen, indem es neben Sauerstoff als zusätzliches Oxidationsmittel auftritt, das in relativ kurzer Zeit umgesetzt wird. Über die Oxidation von $DCPIPH_2$ durch H_2O_2 unter den Versuchsbedingungen ist aber nichts bekannt.

Liegt eine Mehler-Reaktion vor, dann sollte die Zunahme der Rückoxidationsgeschwindigkeit beim Ausschalten des Lichts gegenüber dem stationären Wert der Rückoxidation von dem

Sauerstoffgehalt des durchgeleiteten Gases abhängen. Im Gegensatz zu dieser Erwartung zeigt aber die Differenz zwischen der anfänglichen Rückoxidationsgeschwindigkeit und der stationären Rückoxidationsgeschwindigkeit keine signifikante Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt des durchgeleiteten Gases. Das schließt eine Mehler-Reaktion aber nicht aus: z.B. könnte der Sauerstoff in statu nascendi zu H_2O_2 reduziert werden.

G. Ausblick

Wäre die Rückoxidation gleich nach Abschalten des Lichts proportional zu der Konzentration an Sauerstoff und an $DCPIPH_2$, so könnte man auf die während der Reduktion gebildete Sauerstoffmenge rückschließen.

Da das nicht der Fall ist, ist eine Untersuchung der Rückoxidation noch viel lohnender. Bei einer Fortführung der Arbeit wäre es interessant, während der Messung der Reduktion und der Rückoxidation ständig die Sauerstoffkonzentration elektrochemisch zu messen, um die jeweilige Rückoxidation mit der momentanen Sauerstoffkonzentration vergleichen zu können; man könnte so auf einfache Weise feststellen, ob noch ein anderes Oxidationsmittel außer Sauerstoff gebildet worden ist, und welchen Anteil der Sauerstoff an der anfänglich erhöhten Rückoxidationsgeschwindigkeit hat.

Es wäre auch interessant, bei längerer Belichtung die Reaktionen im stationären Zustand zu untersuchen - man müßte dann gleichzeitig zur Messung der DCPIP-Konzentration die Sauerstoffkonzentration, die CO_2-Fixierung und die ATP-Bildung verfolgen.

Die Durchsicht der Literatur ergab, daß es bis jetzt noch keine Arbeit gibt, in der alle diese Meßverfahren gleichzeitig angewendet werden - von solch einer Arbeit wären aber große Fortschritte zur Deutung der Rückoxidation von $DCPIPH_2$ und der Reduktion von DCPIP zu erwarten.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ein kontinuierlich arbeitendes Verfahren zur spektralphotometrischen Messung der Hill-Aktivität[+)] von Chloroplasten mit Dichlorphenol-Indophenol (DCPIP) wurde entwickelt; die Eignung des Meßverfahrens wurde durch Variation verschiedener Parameter (Chloroplastenkonzentration, Beleuchtungsintensität, Temperatur) und Vergleich der Meßdaten mit den Ergebnissen anderer Autoren gesichert. -

Es wird gezeigt, daß bei solchen Messungen die Rückoxidation von reduziertem DCPIP ($DCPIPH_2$) durch gelösten Sauerstoff zu berücksichtigen ist, und daß bei den zur Messung von Hill-Aktivitäten allgemein üblichen DCPIP-Konzentrationen die Reduktionsreaktion keine reine Reaktion nullter Ordnung in Bezug auf den Farbstoff ist.

Für Aktivitätsmessungen muß man aber verlangen, daß die Reduktionsreaktion nullter Ordnung ist, so daß die maximale Hill-Aktivität (k_m) gemessen wird. Die Reduktion von DCPIP geht mit abnehmender DCPIP-Konzentration allmählich von einer Reaktion nullter Ordnung in eine Reaktion erster Ordnung über. Hill-Aktivitäten, die bei kleinen DCPIP-Konzentrationen gemessen wurden, können jedoch auf hohe DCPIP-Konzentrationen extrapoliert werden; es wird ein Extrapolationsverfahren in drei Schritten entwickelt:

1) Der Einfluß von gelöstem Sauerstoff auf die Hill-Aktivität und auf die Rückoxidation von $DCPIPH_2$ wurde untersucht. Die Reduktion von DCPIP ist von der Konzentration an gelöstem Sauerstoff unabhängig. Die Rückoxidation von $DCPIPH_2$ wurde im Dunkeln in Abhängigkeit von der Zeit ge-

---

+) Als Hill-Aktivität bezeichnet man die Geschwindigkeit, mit der Oxidationsmittel im Licht durch Chloroplasten unter gleichzeitiger Entwicklung von Sauerstoff reduziert werden.

messen. In den ersten Minuten nach dem Abschalten des Lichts läßt sich die Rückoxidation nicht durch den Ansatz $d[DCPIPH_2]/dt = - k_r \cdot [O_2] \cdot [DCPIPH_2]$ beschreiben. Eindeutige Rückschlüsse von der Rückoxidation auf die während der Belichtung gebildete Sauerstoffmenge sind nicht möglich.

2) Es wird ein Verfahren zur Berechnung korrigierter Reduktionskurven beschrieben. Die korrigierten Reduktionskurven geben an, wie die Reduktion ohne gleichzeitige Rückoxidation von $DCPIPH_2$ verlaufen würde.

3) Die Konzentrationsabhängigkeit der Hill-Aktivität wird mit Hilfe eines einfachen Reaktionsschemas interpretiert. Die Abweichungen der DCPIP-Reduktion von einer Reaktion nullter Ordnung lassen sich mit einer einzigen Konstanten (b) beschreiben:

$$d\,[DCPIP]/dt = - k_m \,/\, (1 + b \,/\, [DCPIP])$$

Die Konstante b ist die DCPIP-Konzentration, bei welcher die Hill-Aktivität die Hälfte des maximalen Wertes (k_m) beträgt. Für b findet man:
10^{-5} Mol/l < b < 10^{-4} Mol/l. k_m läßt sich auf ± 5% genau bestimmen.

Der Konzentrationsbereich, in welchem der Übergang der Reduktionsreaktion von nullter zu erster Ordnung stattfindet, kann durch Nebenreaktionen zu höheren Konzentrationen verschoben werden. Es wird gezeigt, daß u.a. die CO_2-Reduktion unter den üblichen Versuchsbedingungen als solche Nebenreaktion auftreten kann.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Anderson, J.M., N.K.Boardman, Biochim.Biophys.Acta 112, 403-421, 1966: Fractionation of the photochemical systems of photosynthesis. I. Chlorophyll contents and photochemical activities of particles isolated from Spinach chloroplasts.

Armstrong, J.McD., Biochim.Biophys.Acta 86, 194-197, 1964: The molar extinctions coefficient of 2,6-dichlorophenol indophenol.

Arnon, D.I., Plant Physiol. 24, 1-15, 1949: Copper enzymes in isolated chloroplasts. Phenoloxidase in Beta vulgaris.

Avron, M., D.W.Krogmann, A.T.Jagendorf, Biochim.Biophys. Acta 30, 144-153, 1958: The relation of photosynthetic phosphorylation to the Hill-Reaction.

Baldry, C.W., C.Bucke, D.A.Walker, Biochim.Biophys.Acta 126, 207-213, 1966: Temperature and photosynthesis. - I. Some effects of temperature on carbon dioxide fixation by isolated chloroplasts.

Battino, R., H.L.Clever, Chem.Rev. 66, 395-463, 1966: Solubility of gases in liquids.

Bekina, R.M., E.S.Mikhailova, I.M.Mosolova, N.M.Sisakyan: Dokl.Biochem.Sect.Engl.Transl. 167, 83, 1966: Activating effect of ATP on the Process of uptake of O_2 by illuminated chloroplasts.

Biggins, J., K.Sauer, Biochim.Biophys.Acta 88, 655-657, 1964: Action spectrum of the Hill reaction with ferricyanide and ferricyanide/indophenol by isolated chloroplasts.

Bishop, N.I., R.Lumry, J.D.Spikes, Arch.Biochem.Biophys., 58, 1-18, 1955: The mechanism of the photochemical activity of isolated chloroplasts. I. Effect of temperature.

Blackman, F.F., Annals of Botany IX, 281-295, 1905: Optima and limiting factors.

Constantopoulos, G., C.N.Kenyon, Plant Physiol. 43, 531-536, 1968: Release of free fatty acids and loss of Hill activity by aging Spinach chloroplasts.

Diebler, H., Ber.Bunsenges.Physik.Chem. 67, 396-402, 1963: Kinetische Untersuchungen über die reversible Redox-Reaktion von $Fe(CN)_6^{4-}$ mit Dichlorphenol-indophenol.

Fredricks, W.W., A.T.Jagendorf, Arch.Biochem.Biophys. 104, 39-49, 1964: A soluble component of the Hill Reaction of Anacystis nidulans.

Fujita, Y., J.Myers, Arch.Biochem.Biophys. 112, 506-511, 1965: The 2,6-Dichlorphenol Indophenol - Hill Reaction by a cell-free preparation of Anabaena cylindrica.

Good, N.E., Biochim.Biophys.Acta 40, 502-517, 1960: Activation of the Hill Reaction by amines.

Grishina, G.S., N.P.Voskresenskaya, Dokl.Biol.Sci.Sect. 151, 1069, 1964: The dependence on light of the oxygen absorption of chloroplasts.

Grishina, G.S., N.P.Voskresenskaya, Soviet Plant Physiol. 13, 830-835, 1966: Comparative spectral efficiency of saturating light intensities in the Mehler Reaction / Pea-D, Spinach-D chloroplasts photosynthesis.

Gromet-Elhanan, Z., M.Avron, Biochem.Biophys.Res.Commun. 10, 215-220, 1963: Photophosphorylation coupled to the reduction of indophenol dyes.

Gromet-Elhanan, Z., M.Avron, Biochemistry 3, 365-373, 1964: The role of indophenol dyes in photoreactions of chloroplasts.

Handbook of Chemistry and Physics, 39th Edition, p. 1606, Chemical Rubber Publishing Co, Cleveland, Ohio, 1957.

Hill, R., Nature 139, 881-882, 1937: Oxygen evolved by isolated chloroplasts.

Hill, R., R.Scarisbrick, Proc.Roy.Soc. (London) B.127, 192-210, 1939: The reduction of ferric oxalate by isolated chloroplasts.

Hind, G., A.T. Jagendorf, Proc.Natl.Acad.Sci., U.S. 49, 715-722, 1963: Separation of light and dark stages in photophosphorylation.

Hind, G., A.T. Jagendorf, Z.Naturforsch. 18b, 689-694, 1963: Operation of cofactors in two-stage photophosphorylation.

Holt, A.S., C.S.French, Arch.Biochem.Biophys. 9, 25-43, 1946: The photochemical production of oxygen and hydrogen ion by isolated chloroplasts.

Holt, A.S., C.S.French, Arch. of Biochemistry 19, 368-378, 1948: Oxygen production by illuminated chloroplasts suspended in solutions of oxidants.

Holt, A.S., R.F.Smith, C.S.French, Plant Physiol. 26, 164-173, 1951: Dye reduction by illuminated chloroplast fragments.

Izawa, S.,G.Hind, Biochim.Biophys.Acta 143, 377-390, 1967: The kinetics of the p_H rise in illuminated chloroplast suspensions.

Jagendorf, A.T., Arch.Biochem.Biophys. 62, 141-150, 1956: Oxidation and reduction of pyridin nucleotides by purified chloroplasts.

Katoh, S., A.S.Pietro, Arch.Biochem.Biophys. 118, 488-496, 1967: The role of c-type cytochrome in the Hill reaction with Euglena chloroplasts.

Kok, B., E.A.Datko, Plant Physiol. 40, 1171-1177, 1965: Reducing power generated in the second photoact of photosynthesis.

Krogmann, D.W., A.T.Jagendorf, Plant Physiol. 34, 277-282, 1959: Comparison of ferricyanid and 2,3',6-trichlorphenolindophenol as Hill Reaction oxidants.

Krogmann, D.W., B.Vennesland, J.Biol.Chem. 234, 2205-2210, 1959: Oxidative photosynthetic phosphorylation by Spinach chloroplasts.

Lumry, R., R.E.Wayrynen, J.D.Spikes, Arch.Biochem.Biophys. 67, 453-465, 1957: The mechanism of the photochemical activity of isolated chloroplasts. II. Quantum requirements.

Lumry, R., J.D.Spikes, Research in Photosynthesis. H.Gaffron, ed., Pp. 373-391, Interscience, New York, 1957: Chemical - kinetic studies of the Hill reaction.

Mac Arthur, C.G., J.physic.Chem. 20, 495-502, 1916: Solubility of oxygen in salt solutions and the hydrates of these salts.

Macdowall, F.D.H., Plant Physiol. 24, 462-480, 1949: The effects of some inhibitors of photosynthesis upon the photochemical reduction of a dye by isolated chloroplasts.

Mackinney, G., J.Biol.Chem. 140, 315-322, 1941: Absorption of light by chlorophyll solutions.

Malkin, S., Biochim.Biophys.Acta 153, 188-196, 1968: Analysis of the 'weak light effect' on the fluorescence yield in isolated chloroplasts.

McCarty, R.E., A.T.Jagendorf, Plant Physiol. 40, 725-735, 1965: Chloroplast damage due to enzymatic hydrolysis of endogenous lipids.

Mehler, A.H., Arch.Biochem.Biophys. 34, 339-351, 1951: Studies on reactions of illuminated chloroplasts. II. Stimulation and inhibition of the reaction with molecular oxygen.

Milner, H.W., C.S.French, M.L.G.Koenig, N.S.Lawrence, Arch. Biochem.Biophys. 28, 193-200, 1950: Measurement and stabilization of activity of chloroplast material.

Müller, C., Z.physik.Chem. 81, 483-503, 1913: Die Absorption von Sauerstoff, Stickstoff und Wasserstoff in wäßrigen Lösungen von Nichtelektrolyten.

Park, R.B., J.Kelly, S.Drury, K.Sauer, Proc.Nat.Acad.Sci. USA 55, 1056-1062, 1966: The Hill reaction of chloroplasts isolated from glutaraldehyde - fixed Spinach leaves.

Punnett, Th., Plant Physiol. 34, 283-289, 1959: Stability of isolated chloroplast preparations and its effect on Hill reaction measurements.

Ridley, S.M., R.M.Leech, Progress in Photosynthesis Research, H.Metzner, Ed., Vol.I, 229-244, 1969: Chloroplast survival in vitro.

Rieske, J.S., R.Lumry, J.D.Spikes, Plant Physiol. 34, 293-300, 1959: The mechanism of the photochemical activity of isolated chloroplasts. III. Dependence of velocity of light intensity.

Schürmann, P., Progress in Photosynthesis Research, H.Metzner, Ed., Vol. III, Tübingen, 1969 (im Druck): The effect of CO_2-carriers on the CO_2 fixation of isolated chloroplasts.

Schwartz, M., Biochim.Biophys.Acta 102, 361-372, 1965: Light effects on oxygen evolution and photophosphorylation in Spinach chloroplasts.

Shen, Y.K., G.M.Shen, Scientia Sinica 11, 1097-1106, 1962: Studies on photophosphorylation. II. The "light intensity effect" and intermediate steps of photophosphorylation.

Shen, G.M., S.Y.Yang, Y.K.Shen, H.C.Yin, Scientia Sinica Peking 12, 685-694, 1963: Photophosphorylation. VI. Photophosphorylation coupled with the photoreduction of 2,6-Dichlorophenolindophenol.

Spikes, J.D., R.Lumry, H.Eyring, R.E.Wayrynen, Arch.Biochem. Biophys. 28, 48-68, 1950: Potential changes in suspensions of chloroplasts on illumination.

Spikes, J.D., R.Lumry, J.S.Rieske, R.J.Marcus, Plant Physiol. 29, 161-164, 1954: Recording oxidation - reduction potentials in plant preparations.

Stiller, M., Biochim.Biophys.Acta 94, 53-63, 1965: Further studies on photophosphorylation accompanying the Hill reaction with ferricyanide.

Stiller, M., B.Vennesland, Biochim.Biophys.Acta 60, 562-579, 1962: Photophosphorylation accompanying the Hill reaction with ferricyanide.

Swenson, A.D., L.P.Vernon, Biochim.Biophys.Acta 102, 349-353, 1965: Oxygen evolution coupled to reduction of manganipyrophosphate ion by illuminated chloroplasts.

Vernon, L.P., E.Shaw, Plant Physiol. 40, 1269-1277, 1965: Photochemical activities of Spinach chloroplasts following treatment with Triton X - 100.

Walker, D.A., Plant Physiol. 40, 1157-1161, 1965: Correlation between photosynthetic activity and membrane integrity in isolated pea chloroplasts.

Walker, D.A., R.Hill, Biochim.Biophys.Acta 131, 330-338, 1967: Relation of oxygen evolution to carbon assimilation with isolated chloroplasts.

Warburg, O., C.Jetschmann, G.Krippahl, Z.Naturforsch. 20b, 993-996, 1965: Widerlegung der Photolyse des Wassers und Beweis der Photolyse der Kohlensäure nach Versuchen mit lebender Chlorella und den Hill-Reagenzien Nitrat und K_3 $Fe(CN)_6$.

Wassermann, A.R., S.Fleischer, Biochim.Biophys.Acta 153, 154-169, 1968: The stabilization of chloroplast function.

Wessels, J.S.C., Dissertation, 1954, (Leyden): Investigations into some aspects of the Hill reaction.

West, J., R.Hill, Plant Physiol. 42, 819-826, 1967: Carbondioxide and the reduction of indophenol and ferricyanide by chloroplasts.

Wolf, F.T., Phytochemistry 5, 263-265, 1966: The effects of some synthetic quinones on the Hill reaction in Spinach chloroplasts.

LEBENSLAUF

Am 19. Februar 1939 wurde ich, Karen Uta Nickel, geb. Brüstlein, in Berlin-Spandau geboren. Meine Eltern sind: Dr.rer.pol. Arwed Brüstlein und Karen Brüstlein, geb. Ermel, Realschullehrerin.

Ab Herbst 1945 bis Ostern 1949 besuchte ich die Volksschule; anschließend besuchte ich das Gymnasium in Varel/O., an dem ich im März 1958 die Reifeprüfung ablegte.

Im SS 1958 und WS 1958/59 studierte ich in Freiburg/Breisgau Botanik und Chemie. Ab April 1959 besuchte ich das Technikum für Chemie und Physik, Dr. Grübler, in Isny/Allgäu mit der Fachrichtung Chemie und legte dort im Mai 1961 das Staatsexamen für Chemotechniker ab. Von Juni 1961 bis April 1963 arbeitete ich in Tübingen im Institut für Physikalische Chemie bei Prof. Dr. G. Kortüm als chemisch-technische Assistentin. Im SS 1963 setzte ich mein Studium (Botanik/Chemie) in Tübingen fort. Im SS 1964 studierte ich in Wien und kehrte im WS 1964/65 nach Tübingen zurück.

Ab Anfang 1966 arbeitete ich unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Metzner im Institut für Chemische Pflanzenphysiologie der Universität Tübingen an der vorliegenden Dissertation: "Über den Einfluß von Sauerstoff auf den Verlauf der Hill-Reaktion mit DCPIP". Die Versuche wurden im August 1968 abgeschlossen.

Seit August 1967 bin ich mit dem Diplom-Chemiker Dr. Bernhard Nickel verheiratet.

Meine akademischen Lehrer waren:

in Isny/Allgäu: Prof.Arzt, Prof.Dr.Grübler, Dr.Hinz,
Dr.Jaensch, Dr.Schrempp, Dipl.-Chem. Bach

und die Herren Professoren:

in Freiburg: Brauer, Jander, Lüttringhaus, Oehlkers;

in Wien: Breitenbach, Ehrendorfer, Höfler, Hofmeister,
Kuffner, Polansky, Rechinger;

in Tübingen: E.Bayer, Bünning, Kortüm, Mauser, Metzner,
E.Müller, Nultsch, Richter, Schweizer,
Schwemmle.